



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM AZEITES DE
OLIVA EXTRA VIRGEM VIA CG/DIC**

Nayara Batista da Silva

Belo Horizonte-MG

2010



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM AZEITES DE
OLIVA EXTRA VIRGEM VIA CG/DIC**

Nayara Batista da Silva

Monografia apresentada ao Curso de
Química Tecnológica do CEFET-MG como
parte das exigências da disciplina Trabalho
de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientador: **Prof. Dr. Cleverson F. Garcia**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cleverson F. Garcia (orientador)

Prof^a Dra. Silvia Mendonça Vieira

Prof. Dr. Claudinei Resende Calado

Monografia aprovada em 05 de julho de 2010

Belo Horizonte-MG

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Ministério da Agricultura, em especial à Eugenia e Rosinalva por permitir a realização da parte prática deste trabalho no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA.

À minha companheira de laboratório Adriana Leal, pelo apoio e companheirismo, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Ao meu orientador prof. Cleverson Garcia, pela orientação durante esses 12 meses, dedicando seu tempo para execução deste trabalho.

À minhas amigas Mislene e Luciana pela paciência nos momentos de dificuldade e pelo apoio sempre que precisei.

À minha irmã, Ana Flavia e meu padrasto Elton, pela amizade e apoio.

Aos meus pais pelo apoio aos estudos, em especial a minha mãe que sempre me motivou, investindo em mim de todas as formas possíveis, confiando e acreditando no meu potencial.

E principalmente a Deus, que me protege e carrega em seus braços em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis, por ter me capacitado e dado forças para seguir até aqui com humildade e perseverança.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ANVISA | Agência nacional de vigilância sanitária |
| AOCS | Sociedade química americana de óleos |
| CGAL | Coordenação geral de laboratórios |
| CNNPA | Comissão nacional de normas e padrões para alimentos |
| COI | Conselho oleícola internacional |
| DIC | Detector de ionização de chama |
| EU | União Européia |
| GC | Cromatografia gasosa |
| ISO | Organização internacional para padronização |
| IUPAC | União internacional de química pura e aplicada |
| LACQSA | Laboratório de controle de qualidade e segurança alimentar |
| LANAGRO | Laboratório nacional agropecuário |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| SDA | Secretaria de defesa agropecuária |

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

| | pg. |
|---|-----|
| Figura 1: Fotografia de parte de uma oliveira (<i>Olea europaea</i> ssp.)..... | 3 |
| Figura 2: Representação estrutural dos triacilgliceróis encontrados em azeite de oliva..... | 4 |
| Figura 3: Representação estrutural do esqualeno..... | 5 |
| Figura 4: Representação estrutural do β -caroteno..... | 6 |
| Figura 5: estrutural do α -tocoferol..... | 6 |
| Figura 6: Representação estrutural dos esteróides encontrados no azeite de oliva..... | 6 |
| Figura 7: Representação estrutural dos compostos fenólicos luteolina e quercitina..... | 7 |
| Figura 8: Sistema de cintas transportadoras..... | 12 |
| Figura 9: Moinho utilizado no processo de extração do azeite de oliva..... | 12 |
| Figura 10: Batedora da pasta de azeitonas empregada na obtenção do azeite de oliva..... | 13 |
| Figura 11: Sistema de decantação e de separação via centrifugação do azeite de oliva..... | 14 |
| Figura 12: Barris de armazenamento do azeite de oliva..... | 15 |
| Figura 13: Representação genérica da hidrólise de um triacilglicerol..... | 19 |
| Figura 14: Decomposição oxidativa do ácido linoléico..... | 22 |
| Figura 15: Cromatograma da amostra A..... | 34 |
| Figura 16: Cromatograma da amostra B..... | 35 |
| Figura 17: Cromatograma da amostra C..... | 37 |
| Figura 18: Cromatograma da amostra D..... | 38 |
| Figura 19: Cromatograma da amostra E..... | 39 |
| | |
| Fluxograma 1: Sistema de produção do azeite de oliva..... | 11 |

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

| | pg. |
|---|-----|
| Tabela 1: Consumo mundial de azeite de oliva (milhões de toneladas) entre as safras de 2000/2001 e a previsão de 2009/2010..... | 8 |
| Tabela 2: Composição de ácidos graxos no azeite de oliva..... | 21 |
| Tabela 3: Características das amostras de azeite de oliva extra virgem... | 31 |
| Tabela 4: Comparação entre os tempos de retenção dos componentes das amostras e dos padrões de ácidos graxos esterificados..... | 32 |
| Tabela 5: Teor de ácidos graxos na amostra A via normalização e normalização com cálculo do fator de correção..... | 34 |
| Tabela 6: Teor de ácidos graxos na amostra B via normalização e normalização com cálculo do fator de correção..... | 36 |
| Tabela 7: Teor de ácidos graxos na amostra C via normalização e normalização com cálculo do fator de correção..... | 37 |
| Tabela 8: Teor de ácidos graxos na amostra D via normalização e normalização com cálculo do fator de correção..... | 38 |
| Tabela 9: Teor de ácidos graxos na amostra E via normalização e normalização com cálculo do fator de correção..... | 39 |
| Gráfico 1: Importação de azeite de oliva no Brasil entre 1990 a 2009..... | 9 |

SUMÁRIO

| | pg. |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Perfil químico do azeite de oliva..... | 3 |
| 2.2 Produção e consumo de azeite de oliva..... | 7 |
| 2.3 Benefícios do azeite de oliva para a saúde..... | 9 |
| 2.4 Processos de obtenção..... | 10 |
| 2.5 Classificação do azeite de oliva..... | 15 |
| 2.5.1. <i>Azeite de oliva virgem.....</i> | 15 |
| 2.5.2 <i>Azeite de oliva refinado.....</i> | 16 |
| 2.5.3 <i>Azeite de oliva.....</i> | 16 |
| 2.5.4 <i>Azeite composto.....</i> | 16 |
| 2.5.5 <i>Óleo de bagaço de azeitona.....</i> | 16 |
| 2.6 Legislação e padrões de qualidade e identidade..... | 17 |
| 2.7 Adultrações..... | 23 |
| 2.8 Determinação de ácidos graxos em óleos e azeites..... | 24 |
| 2.8.1 Normalização..... | 24 |
| 2.8.2 Normalização com fatores de correção..... | 25 |
| 2.8.3 Normalização com cálculo de padrão interno..... | 26 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| 3.1 Considerações gerais sobre o trabalho..... | 28 |
| 3.2 Aquisição e registro das amostras..... | 28 |
| 3.3 Preparo das amostras..... | 28 |
| 3.4 Condições cromatográficas..... | 29 |
| 3.5 Identificação e quantificação dos ácidos graxos..... | 29 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 4.1 Perfil das amostras..... | 31 |
| 4.2 Identificação dos ácidos graxos..... | 31 |
| 4.3 Quantificação dos ácidos graxos e avaliação das amostras comerciais de azeite de oliva extra virgem..... | 34 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 42 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

1. INTRODUÇÃO

Azeite de oliva é o óleo obtido diretamente do fruto da árvore de oliva (*Olea europaea* L.), excluindo-se os óleos que são obtidos através de processos de extração por meio de solventes ou de reesterificação, além de qualquer mistura com óleos de outras fontes (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, 2008).

O azeite de oliva é o único produto no setor de óleos e gorduras que possui seu próprio acordo internacional de comércio. O Conselho Oleícola Internacional (COI) é a organização intergovernamental responsável pela administração desse acordo, o qual tem sido constantemente negociado nas conferências sobre produtos alimentícios nas Nações Unidas. A norma de comércio do COI estabelece teores mínimos de pureza do produto e critérios de qualidade para cada categoria de azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva. Também são estabelecidas normas de higiene, embalagem e rotulagem, além da recomendação de aplicação de determinados métodos analíticos (AUED-PIMENTEL et al, 2008).

Os critérios de pureza estipulados pelo COI são fundamentais na fiscalização de azeites de oliva comerciais, tendo em vista a ocorrência de adulterações, motivadas pelo alto valor econômico agregado dos produtos (CONTIÑAS, MARTÍNEZ et al, 2008). Tais critérios são os mesmos encontrados na norma *Codex Stan 33* (2003) para azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva, os quais devem ser seguidos atualmente no Brasil na fiscalização destes óleos. As metodologias recomendadas para a determinação dos diferentes parâmetros previstos nas normas do COI foram desenvolvidas por organizações internacionais como a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Organization for Standardization (ISO) e empregam, em grande parte, técnicas cromatográficas na avaliação da identidade e qualidade dos diferentes tipos de azeite (AUED-PIMENTEL et al, 2008).

A produção e comercialização de azeites de oliva adulterados acarretam uma concorrência desleal, pois garantem aos adulteradores menores preços, além de enganar os consumidores que compram uma mistura de óleos como se fosse azeite de oliva puro (INMETRO, 2000).

O tipo de adulteração mais comum é a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial ou a adição de azeites comercialmente inferiores, principalmente quando o azeite de oliva é enlatado no Brasil. Entretanto, outras fraudes menos comuns, relativas à qualidade do azeite, são praticadas e se mostram de difícil detecção devido às diferentes categorias de azeites existentes (AUED-PIMENTEL, 2008; TAKEMOTO et al, 2002).

No Brasil, a legislação vigente para azeites faz parte do regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme (ANVISA, 2005).

Existe uma preocupação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em padronizar métodos que permitam monitorar a qualidade e identificar as possíveis fraudes do azeite de oliva, garantindo que o produto disponível no mercado atenda as especificações da Resolução nº 22/77 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde (BRASIL, 1977), e não forneça risco à população.

Atualmente, o MAPA vem trabalhando na elaboração de um Regulamento técnico de identidade e qualidade para azeites de oliva, incluindo metodologias analíticas para a implementação deste Regulamento. A partir deste regulamento e da definição e validação de metodologias analíticas, o MAPA poderá atuar técnica e legalmente na fiscalização da entrada deste produto no mercado brasileiro (importação) e no comércio interno.

Entre os critérios de pureza e qualidade do azeite de oliva, a composição de ácidos graxos apresenta grande importância, sendo avaliada por técnicas instrumentais como a Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama (CG-DIC).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar a quantificação de ácidos graxos em 5 amostras comerciais de azeite de oliva extra virgem, através de CG-DIC. Vale ressaltar que toda a parte experimental será realizada no laboratório LACQSA/LANAGRO-MG.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Perfil químico do azeite de oliva

O azeite é um produto alimentar, usado como tempero, produzido a partir da azeitona, fruto das oliveiras (Figura 1). Trata-se, pois, de um alimento clássico da culinária contemporânea, regular na dieta mediterrânea e, nos dias atuais, presente em grande parte das cozinhas. Fatores como a variedade, as técnicas de cultivo aplicadas, a maturação no momento da colheita, as características agro-climáticas do mês e do ano de produção, assim como as possibilidades de composição de vários azeites no momento do envase, permite uma diversidade de características sensoriais deste produto (Jorge et al, Sensorial, Saba et al, 2005).



**Figura 1 – Fotografia de parte de uma oliveira (*Olea europaea* ssp.)
Fonte: AGROSOFT BRASIL (2010)**

As denominações "azeite" e "óleo" se diferem principalmente com relação ao modo de extração. O azeite é obtido através da extração física dos frutos – via aplicação direta de pressão mecânica – e o óleo é extraído com a utilização de solventes (BOSKOU, 2000).

O azeite de oliva, como a maioria dos óleos e gorduras comestíveis, é composto por duas frações: a fração insaponificável (não glicerídica) e a fração saponificável (glicerídica), sendo esta composta por triacilgliceróis,

diacilgliceróis, monoacilgliceróis e fosfolipídeos (RUÍZ-GUTIÉRREZ & PÉREZ-CAMINO, 2000).

A fração saponificável representa 98 a 99% da composição do óleo, sendo os triacilgliceróis os principais componentes (95 a 98% da fração saponificável) (CODEX ALIMENTARIUS, 2003). Entre os triacilgliceróis presentes, cita-se: trioleína (OOO), 2,3-dioleoil-1-palmitoilglicerol (POO), 2-linoleoil-1,3-dioleoilglicerol (OLO), 1-linoleoil-2,3-dioleoilglicerol (LOO), 1-palmitoil-2-linoleoil-3-oleoilglicerol (PLO), 1-estearoil-2,3-dioleoilglicerol (SOO) e 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP) (Figura 2) (AUED-PIMENTEL, 1991; LEHNINGER et al, 2007).

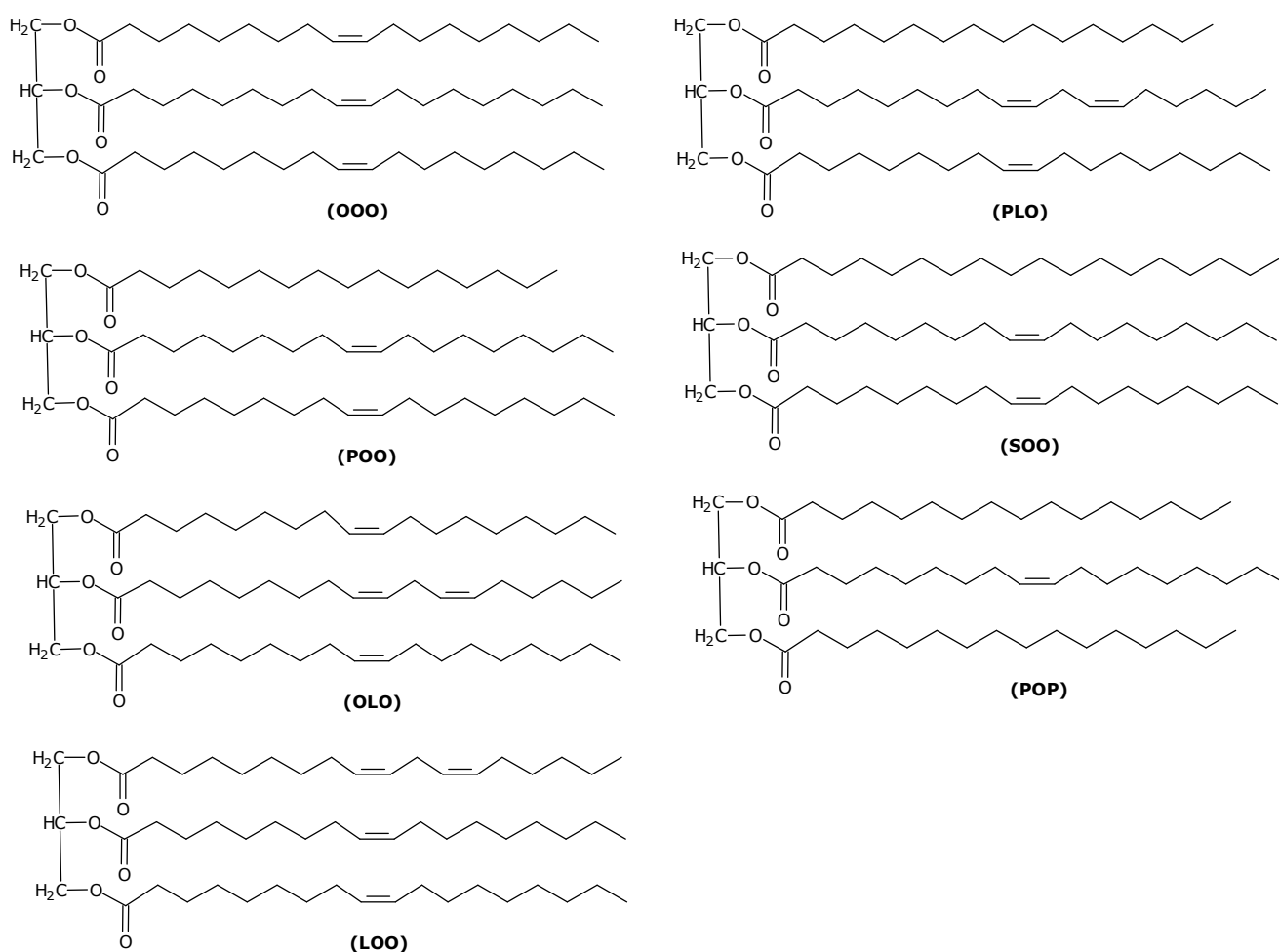


Figura 2 – Representação estrutural dos triacilgliceróis encontrados em azeite de oliva.

A fração insaponificável, por sua vez, é constituída por ácidos graxos, esteróis, hidrocarbonetos, cêras, ésteres de ácidos graxos, álcoois triterpênicos, tocoferóis, flavonóides, entre outras substâncias (SABA et al,

2005).

Os ácidos graxos majoritários do azeite de oliva são: oleico (18:1 Δ^9), podendo representar 80% da massa total dos ácidos graxos, linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1 Δ^9) e esteárico (18:0). Ácidos graxos minoritários, como o linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$), estão presentes no azeite de oliva, mas em quantidades inferiores a 1% (m/m). Segundo Pérez-Camino et al (1987), a presença em grande quantidade de ácidos monoinsaturados como o ácido oleico favorece a estabilidade oxidativa do azeite de oliva, quando comparado a outros óleos vegetais ricos em ácidos graxos poliinsaturados.

Segundo AUED-PIMENTEL (1991), os hidrocarbonetos constituem cerca de 50 a 60% da matéria insaponificável do azeite de oliva, sendo o esqualeno (Figura 3) o principal hidrocarboneto. Sua concentração varia entre 125 a 750 mg/100 g de azeite de oliva e, durante o desenvolvimento dos frutos, atua como precursor na biossíntese de esteróis.

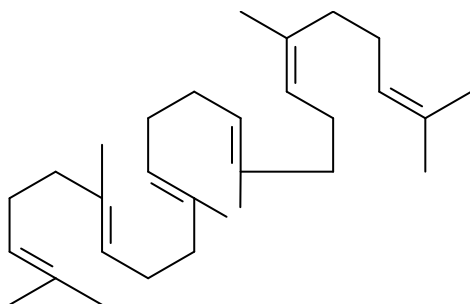


Figura 3 – Representação estrutural do esqualeno.

O β -caroteno (Figura 4) é outro hidrocarboneto encontrado no azeite de oliva. Apresenta importância considerável nos produtos comerciais, pois serve como precursor da vitamina A e, ainda, como antioxidante, sequestrando oxigênio molecular, inibindo a rancificação lipídica (AUED-PIMENTEL, 1991).

Outra classe importante de compostos orgânicos são os tocoferóis, sendo o α -tocoferol (Figura 5) predominante. Sua concentração foi determinada entre 150 e 200 mg/kg de azeite de oliva, teor bem inferior se comparado ao óleo de soja (AUED-PIMENTEL, 1991).

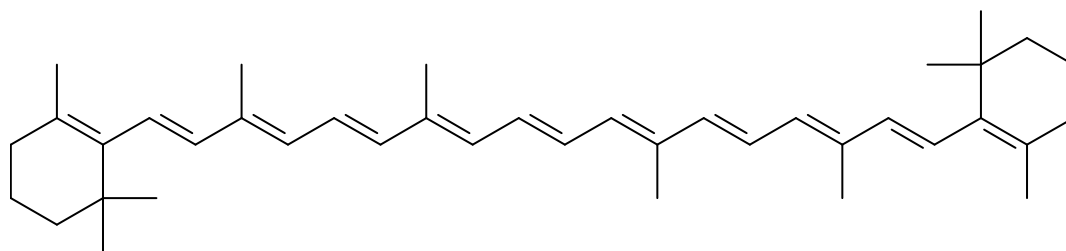


Figura 4 – Representação estrutural do β -caroteno.

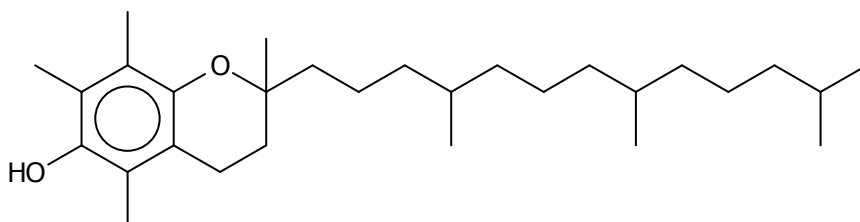


Figura 5 – Representação estrutural do α -tocoferol.

Levando em conta a presença de esteróis, o azeite de oliva contém β -sitosterol (aproximadamente 90% dos esteróis), campesterol, estigmasterol, D7-estigmasterol (Figura 6), entre outros (ITOH et al, 1981). Por sua vez, o conteúdo total varia entre 180 a 265 mg/100g de azeite de oliva (KIRITSAKIS & MARKAKIS, 1987).

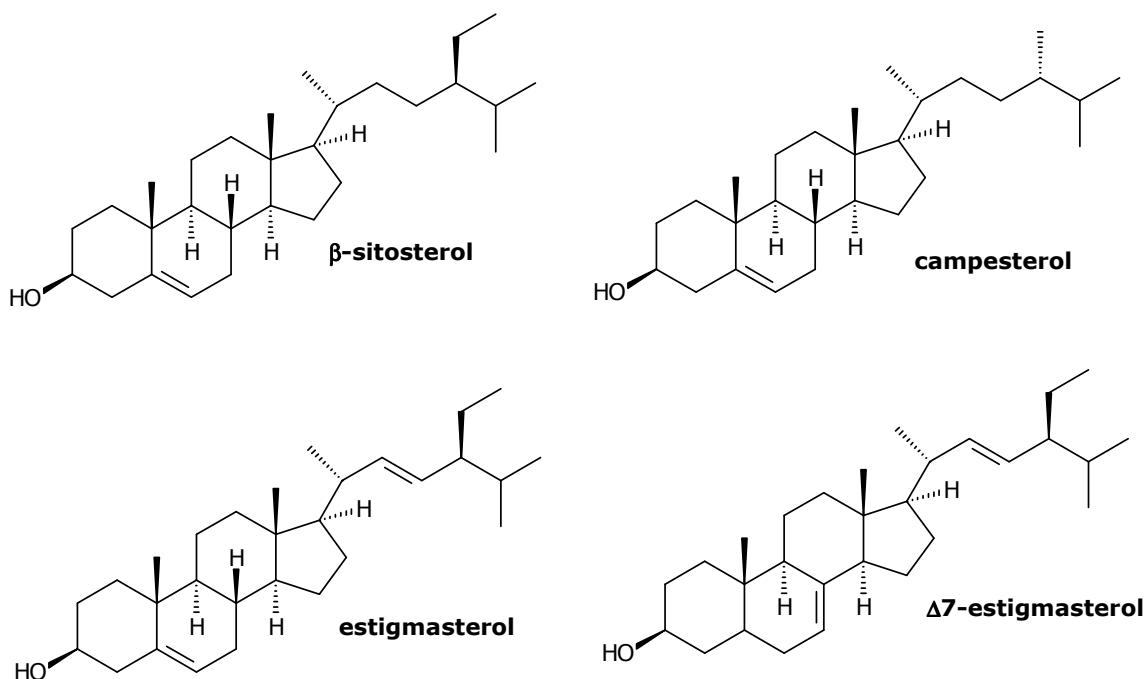


Figura 6 – Representação estrutural dos esteróides encontrados no azeite de oliva.

Por fim, o azeite de oliva pode apresentar quantidades variáveis de substâncias fenólicas, entre elas a luteolina e a quercitina (Figura 7), responsáveis por parte da estabilidade oxidativa do produto. O conteúdo total de substâncias fenólicas varia entre 50 a 500 mg/kg de azeite de oliva (AUED-PIMENTEL, 1991).

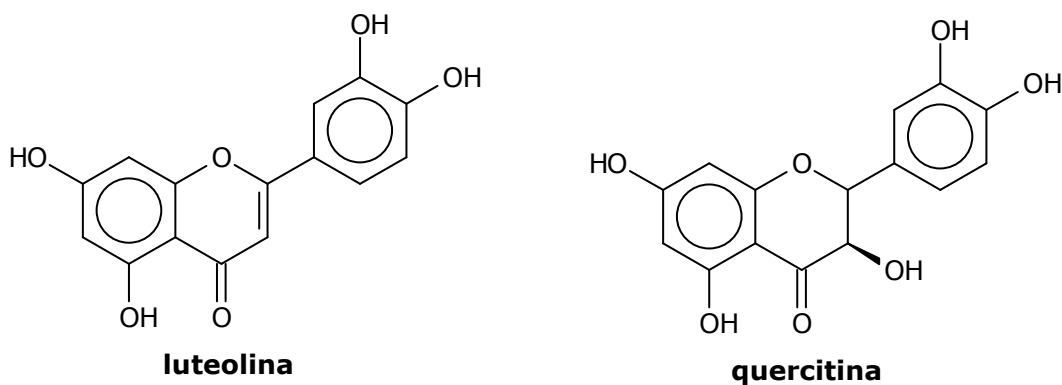


Figura 7 – Representação estrutural dos compostos fenólicos luteolina e quercitina.

2.2 Produção e consumo de azeite de oliva

A produção mundial de azeite de oliva é de aproximadamente 2,7 milhões de toneladas (safras 2008/2009), sem apresentar grande crescimento desde 1996 (COI, 2009). Os países da União Européia representam 81% da produção mundial, sendo a Espanha o maior produtor, com aproximadamente 39% da produção mundial, seguido pela Itália, 21%, e pela Grécia, com 14%. Síria, Turquia, Tunísia e Marrocos produzem conjuntamente 15%. O Brasil, por sua vez, não tem produção considerável de azeite de oliva (ABPIC, 2009).

O consumo mundial de azeite de oliva vem apresentando, desde 1995, uma taxa de crescimento médio anual de 6%, com aproximadamente 2,8 milhões de toneladas (consumo médio 2008/2009, Tabela 1), aproveitando quase toda a produção nas safras recentes. Os países da União Européia representam 71,5% do consumo mundial, sendo a Itália o maior mercado consumidor com 710 mil ton/ano, seguida pela Espanha com 560 mil ton/ano e pela Grécia, com 220 mil ton/ano. Os Estados Unidos da América (EUA) vem apresentando altas taxas de consumo, totalizando mais de 254 mil ton/ano (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, 2009).

Tabela 1: Consumo mundial de azeite de oliva (milhões de toneladas) entre as safras de 2000/2001 e a previsão de 2009/2010.

| País | Safra (milhões de toneladas) | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| | 00/01 | 01/02 | 02/03 | 03/04 | 04/05 | 05/06 | 06/07 | 07/08 | 08/09 | 09/10 (prev.) |
| Algeria | 26,0 | 25,0 | 21,0 | 60,0 | 38,0 | 35,0 | 23,0 | 25,0 | 59,0 | 50,0 |
| Argentina | 6,0 | 5,5 | 5,5 | 5,5 | 5 | 5,5 | 3,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 |
| Europa | 1835,0 | 1894,5 | 1918,5 | 1997,5 | 2079,0 | 1918,0 | 1905,0 | 1866,0 | 1854,5 | 1856,5 |
| Croácia | 6,5 | 5,0 | 6,5 | 4,0 | 4,5 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 7,0 | 7,0 |
| Egito | 1,0 | 1,5 | 3,5 | 2,0 | 2,5 | 2,0 | 8,0 | 7,0 | 5,0 | 5,0 |
| Irã | 3,0 | 2,0 | 1,5 | 3,5 | 5,0 | 6,5 | 5,5 | 7,5 | 7,0 | 7,0 |
| Israel | 13,5 | 14,5 | 15,0 | 13,5 | 16,0 | 16,5 | 15,0 | 16,0 | 16,0 | 16,5 |
| Jordânia | 17,0 | 20,0 | 25,0 | 24 | 25 | 19 | 21 | 23,5 | 23,5 | 29,5 |
| Líbano | 8,0 | 7,0 | 4,5 | 5,0 | 5,0 | 5,5 | 5,0 | 9,0 | 20,0 | 9,5 |
| Líbia | 7,0 | 8,0 | 8,5 | 14,5 | 12,0 | 9,0 | 11,0 | 13,0 | 15,0 | 15,0 |
| Marrocos | 45,0 | 60,0 | 60,0 | 70,0 | 38,0 | 55,0 | 65,0 | 65,0 | 70,0 | 70,0 |
| Montenegro | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Síria | 110,0 | 86,0 | 128,5 | 150,0 | 135,0 | 79,0 | 110,0 | 80,0 | 110 | 120,0 |
| Tunísia | 58,0 | 28,0 | 30,0 | 56,0 | 44,0 | 38,0 | 45,0 | 50,0 | 35,0 | 35,0 |
| Arábia Saudita | 4,0 | 5,0 | 7,0 | 7,5 | 5,5 | 4,5 | 6,0 | 7,5 | 6,5 | 6,5 |
| Austrália | 31,0 | 27,5 | 31,5 | 34,5 | 32,5 | 34,5 | 47,5 | 35,0 | 37 | 37,5 |
| Brasil | 25,0 | 22,5 | 21,0 | 23,5 | 26,5 | 26,0 | 34,5 | 40,0 | 42,0 | 42,5 |
| Canadá | 24,5 | 24,0 | 25,0 | 26,0 | 32,0 | 30,0 | 32,5 | 29,0 | 17,0 | 17,0 |
| USA | 194,5 | 188,5 | 184,0 | 216,5 | 215,5 | 223,0 | 248 | 246 | 254 | 260 |
| Japão | 30,0 | 31,5 | 30,5 | 32,0 | 32,0 | 30,0 | 30,5 | 29 | 29,5 | 29,5 |
| México | 6,5 | 8,0 | 12,0 | 12,0 | 12,0 | 11,5 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 9,5 |
| Palestina | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 12,0 | 10,0 | 10,0 | 15,0 | 13,0 | 16,0 | 12,5 |
| Rússia | 4,0 | 4,0 | 6,0 | 7 | 9 | 9,5 | 10,5 | 17 | 17,5 | 18,0 |
| Taiwan | 8,0 | 6,5 | 5,5 | 4,0 | 4,5 | 4,0 | 3,5 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |
| Turquia | 72,5 | 55,0 | 50,0 | 46,0 | 60,0 | 50,0 | 80 | 85 | 97 | 98 |
| Total/Mundial | 2590,5 | 2606,5 | 2677,5 | 2882,5 | 2923,5 | 2690,5 | 2798,5 | 2754,5 | 2825,5 | 2839 |

Fonte: COI (2009a)

Apesar de não possuir produção considerável, o Brasil se encontra entre os 10 países de maior consumo de azeite de oliva no mundo. Como consequência, entre os anos de 2008 e 2009 o Brasil importou 44,5 mil toneladas de azeite de oliva (Gráfico 1), sendo provenientes de países da

América do Sul (Argentina, Peru e Chile) e da Europa (Espanha e Portugal). Tal perfil de consumo demonstra que, a cada dia, o consumidor brasileiro aprecia mais as características peculiares que o azeite pode proporcionar aos seus pratos. Vale salientar que ainda há potencial de crescimento do respectivo mercado, pois o consumo brasileiro *per capita* ainda é considerado baixo (170 g/ano). Comparativamente, os gregos apresentam um consumo *per capita* da ordem de 25 kg/ano, enquanto italianos e espanhóis consomem 12 kg/ano (OLIVEIRA et al, 2003).

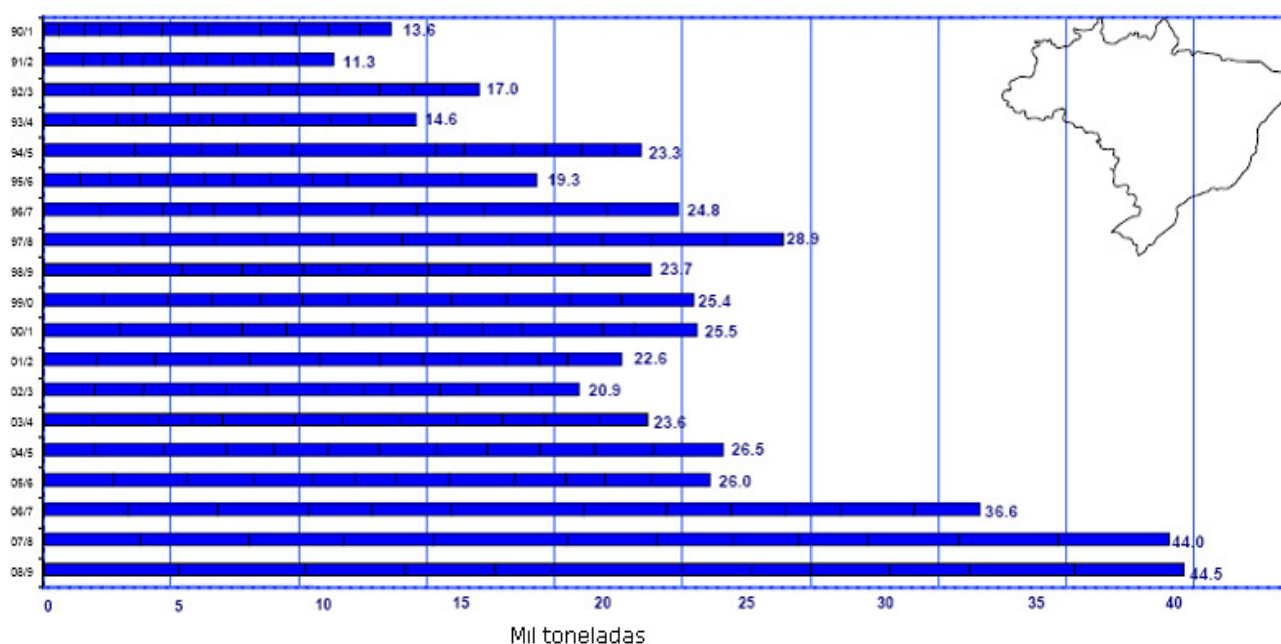


Gráfico 1 – Importação de azeite de oliva no Brasil entre 1990 a 2009.

Fonte: COI (2009b)

A participação específica de mercado do azeite de oliva extra virgem representa 37% do consumo de países como Brasil e Austrália, 20% na Espanha, 50% no Japão, 54% nos EUA, 61% no Canadá, 78% na Itália e 85% na Grécia (ABPIC, 2009).

2.3 Benefícios do azeite de oliva para a saúde

O consumo frequente de azeite de oliva está associado a vários benefícios para saúde humana, tais como menor incidência de enfermidades cerebrovasculares, enfermidades cardiovasculares, obesidade, hipertensão arterial, alguns tipos de câncer e de diabetes *mellitus* (BENEDICO et al, 2002).

Tais benefícios estão relacionados à composição rica em triacilgliceróis de

cadeias graxas insaturadas, principalmente de ácido oléico (Tabela 02). Como consequência, o denominado colesterol "bom", lipoproteínas de alta densidade (HDL), é mantido nos níveis ideais, enquanto que o colesterol "ruim", lipoproteínas de baixa densidade (LDL), é reduzido.

Os ácidos linoléico e linolênico são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos nos humanos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pela espécie humana (MARTIN et al, 2006).

Além disso, o azeite de oliva contém vitamina E (α -tocoferol) e compostos fenólicos, que são antioxidantes capazes de reagir com radicais livres, inibindo a agregação plaquetária e prevenindo a oxidação das LDL (ZAMPELAS et al, 2004).

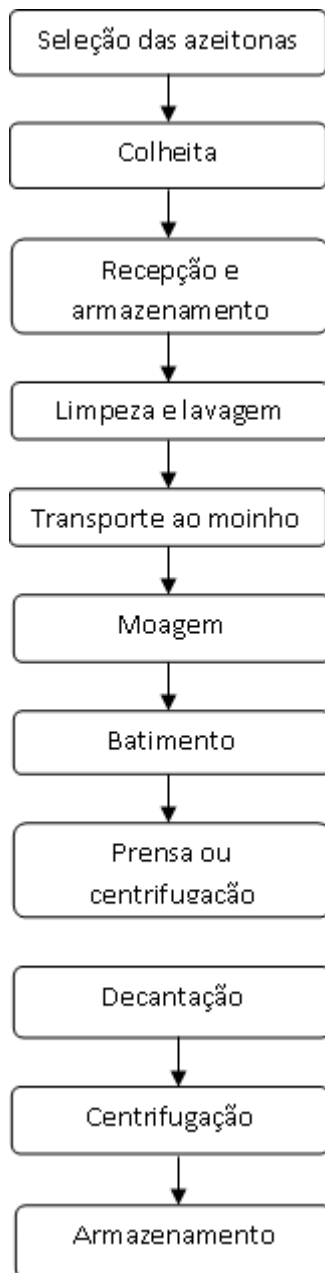
O esqualeno, por sua vez, tem sido indicado como responsável pela inibição da atividade da HMG-CoA redutase, a enzima chave para síntese do colesterol (VISIOLI et al.,2002).

E, por fim, fitoesteróides como o β -sitosterol favorecem a redução do teor do colesterol "ruim" e ajudam na prevenção e combate a diferentes tipos de enfermidades, tais como câncer de próstata, de cólon e de mama (ABPIC, 2009).

2.4 Processo de obtenção

A produção do azeite de oliva equivale a uma sequência de etapas que inicia com a seleção das azeitonas e finaliza com a geração do produto comercial (Fluxograma 01).

A seleção de azeitonas deve ser realizada de tal forma que os frutos apresentem textura firme e estejam intactos. A colheita, por sua vez, deve ser realizada pouco antes do fruto se apresentar completamente maduro (COSTA, 1978).



Fluxograma 1: Sistema de produção do azeite de oliva.
Fonte: UCEDA et al (2006); COSTA (1978).

Na sequência, os frutos são transportados e recebidos pela empresa que irá realizar o beneficiamento. O material é armazenado e passa por um processo de limpeza e lavagem. A Figura 8 evidencia um processo físico de retirada de impurezas sólidas por meio de correntes de ar sobre cintas transportadoras.



**Figura 8 – Sistema de cintas transportadoras.
CAMPIÑAS DE JAÉN (2009).**

É importante que as azeitonas estejam livres de pedras, terra, entre outros sólidos, responsáveis por gerar rupturas na periferia do fruto, favorecendo fermentações indesejadas. Em seguida, os frutos passam por uma nova seleção, mantendo apenas as unidades homogêneas, e sofrem um novo processo de limpeza: aplicação de água corrente para a dissolução e eliminação de impurezas. Em seguida, os frutos limpos podem ser armazenados por um período de, no máximo, 24 horas antes da próxima etapa: a moagem (CAMPIÑAS DE JAÉN, 2009).

A moagem consiste na trituração dos frutos (sem a retirada prévia dos caroços) até a formação de uma mistura composta por uma fase sólida (restos de tecidos vegetais) e outra fase líquida, composta de azeite e água, cuja consistência é controlada adicionando-se água. A Figura 9 evidencia um exemplo de moedor utilizado na fabricação de azeite de oliva (UCEDA et al, 2006).



**Figura 9 – Moinho utilizado no processo de extração do azeite de
oliva.
SABOR ARTESANO (2009).**

A etapa de batimento é feita em uma batedora (Figura 10), composta por uma ou duas seções horizontais de aço inoxidável, pelas quais circula água

quente para o aquecimento da pasta de azeitona, proveniente do moinho. Em seguida, a referida pasta é direcionada ao processo de separação das fases sólida e líquida, podendo ser realizado através de centrifugação ou de prensagem. Independente do processo, a temperatura envolvida não pode ultrapassar 35°C para manter a integridade do azeite de oliva. A prensagem é uma técnica artesanal, onde a pasta moída é colocada em capachos (local onde a pasta de azeitona é prensada), os quais são submetidos a um aumento de pressão. Como consequência, os resíduos sólidos ficam retidos em uma mistura formada pelo azeite e água é liberada. Com o passar do tempo, o azeite se concentra na região superior da mistura graças a sua imiscibilidade com a água e à sua menor densidade.

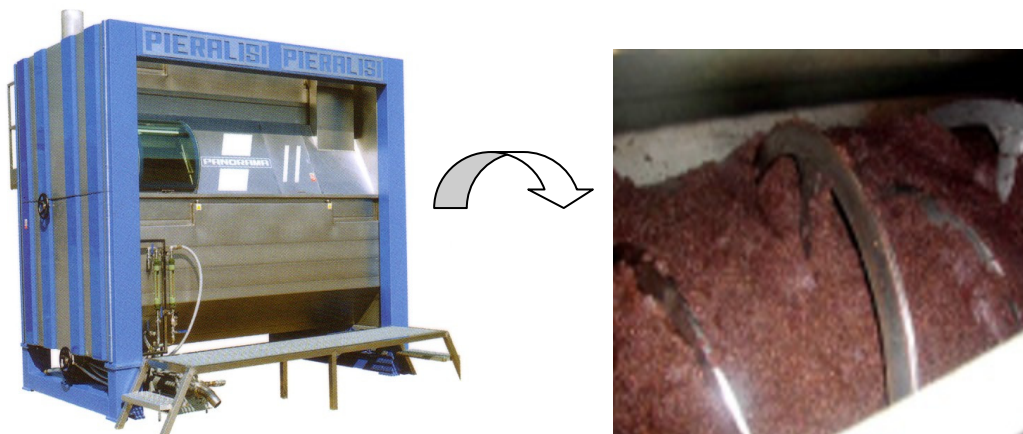


Figura 10 – Batedora da pasta de azeitonas empregada na obtenção do azeite de oliva. SABOR ARTESANO (2009).

RANALLI et al (2001) observaram que o azeite de oliva extra virgem extraído por centrifugação apresenta qualidade inferior ao obtido por prensagem. Isto sugere que a trituração prévia do caroço da azeitona causa um significativo aumento da temperatura, o que resulta em um efeito negativo para a qualidade do azeite.

Por sua vez, a centrifugação pode ser realizada de duas formas: (a) Sistema de três fases: a massa oleosa de azeitonas é diluída adicionando um litro de água para cada quilo de massa. Em seguida, a massa é passada em uma centrífuga horizontal, onde a parte sólida é separada da mistura líquida. (b) Sistema de duas fases: processo similar ao anterior, entretanto não se adiciona água para a centrifugação horizontal. Recicla-se a água obtida da separação de fases líquidas. Esse sistema vem se difundindo

rapidamente, pois apresenta a vantagem de alta capacidade de produção, o que diminui o tempo de estocagem das azeitonas, evitando fermentações indesejadas, evitando a perda, por exemplo, de polifenóis e reduzindo a incidência de impactos ambientais (UCEDA et al., 2006).

Em seguida, a mistura de azeite e água é direcionada ao processo de separação de fases, que ocorre via decantação natural (Figura 06) e, na sequência, por centrifugação (Figura 11).



Decantação azeite de oliva



Centrifuga

Figura 11 – Sistema de decantação e de separação via centrifugação do azeite de oliva. SABOR ARTESANO (2009).

Após a separação de fases, o azeite é armazenado em barris de características isolantes (Figura 12), que não permitem a transferência de odores estranhos ao produto. A faixa de temperatura adequada ao armazenamento é de 15°C a 18°C. Outra característica importante é o controle da luminosidade e do material que compõe os barris. Estes devem

ser elaborados com materiais inertes tais como o azulejo vitrificado, aço inoxidável ou poliéster. Barris de ferro e cobre não são recomendados, pois são suscetíveis à oxidação. De modo geral, o processo descrito para a obtenção do azeite de oliva é classificado como complexo, demorado e de baixo rendimento, uma vez que são necessários 5 kg de azeitonas para a produção de um litro de azeite de oliva (BARRANCO et al., 1998).



Figura 12 – Barris de armazenamento do azeite de oliva. CAMPIÑAS DE JAÉN (2009).

2.5 Classificação do azeite de oliva

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (2008), o azeite de oliva pode ser definido como óleo obtido diretamente dos frutos da árvore de oliva (*Olea europaea* L.), com exclusão de óleos obtidos usando solventes, processos de reesterificação ou qualquer mistura com óleos de outras origens. Os azeites e derivados podem ser comercializados, em conformidade com as seguintes denominações e definições:

2.5.1 Azeite de oliva virgem

É o óleo obtido do fruto da árvore de oliva por processos mecânicos ou outros meios físicos, mantendo-se o controle da temperatura do processo. Tal óleo não deve ser submetido a nenhum outro tratamento, tais como: lavagem, decantação, centrifugação e filtração.

Considerando o azeite de oliva virgem como um produto destinado ao consumo, tem-se a seguinte classificação (COI, 2008):

- Azeite de oliva extra virgem: apresenta acidez livre igual ou menor que 0,8 g de ácido oléico por 100 g de amostra, e as outras características que correspondem aos definidos para esta categoria (demais critérios de pureza e qualidade).
- Azeite de oliva virgem: apresenta acidez livre maior que 0,8 e menor ou igual a 2,0 g de ácido oléico por 100 g de amostra, e as outras características que correspondem aos definidos para esta categoria (demais critérios de pureza e qualidade).
- Azeite de oliva virgem ordinário: Tem acidez livre maior que 2,0 e menor ou igual a 3,3 g de ácido oléico por 100 g de amostra, e as outras características que correspondem aos definidos para esta categoria (demais critérios de pureza e qualidade).

Fica estabelecido que o azeite de oliva virgem é impróprio para o consumo (azeite de oliva virgem lampante) quando apresentar acidez livre maior que 3,3 g de ácido oléico por 100 g de amostra. Tal produto é destinado à refinação ou para fins técnicos.

2.5.2 Azeite de oliva refinado

É o óleo obtido do azeite virgem de oliva por métodos de refino que não alteram a estrutura glicéridica inicial. Ele tem a acidez livre menor ou igual a 0,3 g de ácido oléico por 100 g de amostra.

2.5.3 Azeite de oliva

Consiste na mistura de azeite virgem e refinado próprios para consumo e possui acidez livre menor ou igual a 1 g de ácido oléico por 100 g de amostra.

2.5.4 Azeite composto

Produto de uso popular, com parcela considerável de mercado. É classificado como produto de baixa qualidade, pois corresponde à mistura azeite de oliva virgem lampante:óleo de soja 15:85.

2.5.5 Óleo de bagaço de azeitona

É o óleo obtido por tratamento do bagaço da azeitona com solventes, com exclusão dos óleos obtidos por processo de reesterificação e através da mistura com óleos de outros tipos. Tal produto é comercializado em concordância com as seguintes designações e definições:

- Óleo de bagaço de azeitona bruto: óleo de bagaço de azeitona destinado ao refino, utilizado como alimento para consumo humano ou destinado a outros fins técnicos.
- Óleo de bagaço de azeitona refinado: obtido do óleo de bagaço de azeitona bruto, por métodos de refino que não trazem alterações a estrutura glicérica inicial. Possui acidez livre menor ou igual a 0,3 g de ácido oléico por 100 g de amostra.
- Óleo de bagaço de azeitona: mistura de óleo de bagaço de azeitona refinado e azeite de oliva virgem, próprios para consumo. Tal mistura não deve ser caracterizada como azeite. Possui acidez livre menor ou igual a 1 g de ácido oléico por 100 g de amostra.

2.6 Legislação e padrões de qualidade e identidade

As legislações vigentes estabelecem os critérios de qualidade e pureza, bem como os valores mínimos dos componentes permitidos no azeite de oliva. Entre as mais importantes, pode-se citar as provenientes da União Europeia (EU, 1991), do Conselho Internacional Oleícola (COI, 2008) e o Codex Alimentarius (CODEX, 2003).

As análises baseadas em critérios de qualidade são: características organolépticas, acidez livre, índice de peróxido, espectroscopia na região do ultravioleta, umidade, matéria volátil, impurezas insolúveis em éter de petróleo, ponto de fulgor e metais traços. Por sua vez, as análises baseadas no critério de pureza são: composição em ácidos graxos, teor de ácidos graxos *trans*, composição de esteróis, triterpenos, diálcoois, cêras, estigmastadienos, 2-gliceril-monopalmitato, matéria insaponificável e diferença máxima entre o valor real e teórico de triglicerídeos (ECN 42) (COI, 2008).

No Brasil, a legislação vigente para azeites de oliva faz parte do regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme (ANVISA, 2005).

As características físico-químicas do azeite de oliva são influenciadas por vários fatores, tais como o tipo de solo de cultivo, clima, práticas culturais, variedades e estado de maturação do fruto (INMETRO, 2000).

Segundo Peixoto et al (1998), vários fatores influenciam a acidez do azeite

de oliva: maturação e estocagem das azeitonas, ações enzimáticas, qualidade das azeitonas, sistema de obtenção do azeite virgem e tipo de extração do azeite. Um alto grau de acidez pode ser explicado, entre outros fatores, pelo mau estado de conservação dos frutos, processamentos inadequados ou má conservação. Assim, a determinação da acidez é considerada uma técnica capaz de medir a degradação hidrolítica das cadeias de ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis. A hidrólise forma diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (Figura 13). É geralmente expressa como porcentagem (%) de ácido oléico na amostra, o ácido graxo majoritário do azeite de oliva (VOSSSEN, 2010).

O índice de peróxidos é uma técnica analítica capaz de determinar o estado de oxidação do azeite de oliva e a deterioração de seus antioxidantes naturais, como os tocoferóis e os polifenóis. Os peróxidos formados durante a oxidação do azeite se reduzem na presença de iodo molecular, sendo a relação estequiométrica utilizada no cálculo do teor de peróxidos. Altos teores indicam que a azeitona ou pasta foi manipulada de forma inadequada ou que o produto comercial foi armazenado fora das especificações técnicas (SOUZA, 2006).

A medida de absorvância na região do ultravioleta é o indicador mais sensível de oxidação, especialmente em óleos que foram aquecidos no processo de refino. O método identifica qualitativamente compostos oxidados a 232 nm e a 270 nm através da espectrofotometria no ultravioleta. A absorção nesses comprimentos de onda é devido à presença de sistemas dienos e trienos conjugados, respectivamente. Azeites de oliva de boa qualidade e armazenados sob condições adequadas contem poucos produtos de oxidação. Em alguns casos particulares, azeites de oliva virgens alterados podem exibir características espectrais próximas dos óleos (ZENEON, 2008).

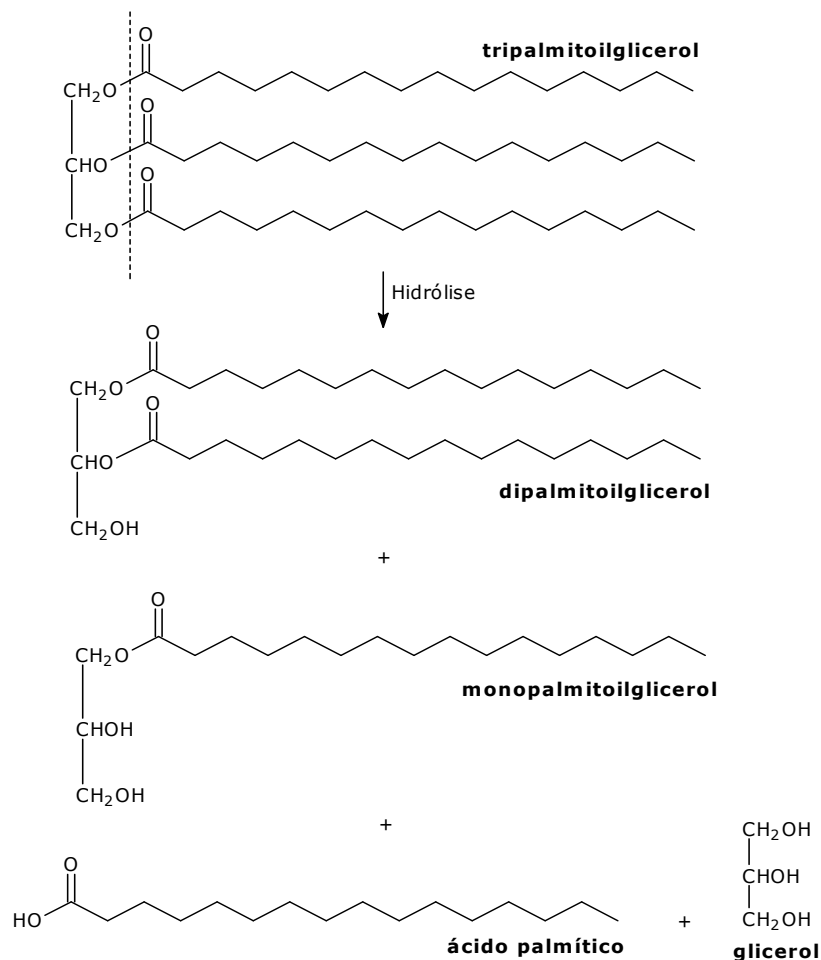


Figura 13 – Representação genérica da hidrólise de um triacilglicerol.

Fonte: VOET e VOET (2000)

A análise de umidade equivale ao teor de água contida no azeite de oliva. Por sua vez, a determinação dos compostos voláteis é responsável pela quantificação das substâncias que apresentam alta pressão de vapor contidas no azeite de oliva (MAPA, 1993). Outra técnica relacionada à pressão de vapor dos constituintes do azeite de oliva é a determinação do ponto de fulgor. Tal método determina a temperatura mínima em que a amostra entra em combustão espontaneamente. Azeite de oliva refinado, óleo de bagaço e óleos de semente tem um ponto de fulgor menor que os azeites de oliva virgens. De modo geral, azeites de oliva virgens apresentam ponto de fulgor entre 210°C e 220°C, enquanto a maior parte de óleos de semente tem ponto de fulgor entre 190°C a 200°C (VOSSEN, 2010).

A medida de impurezas insolúveis identifica a presença de sujeiras,

minerais, resinas, ácidos graxos oxidados, sabões alcalinos de ácidos palmítico e esteárico, e proteínas que estão suspensas no óleo (MAPA, 1993).

Esteróis são importantes componentes da fração não glicerídica do azeite de oliva, sendo sua caracterização realizada por Cromatografia Gasosa. De modo geral, o azeite de oliva apresenta composição peculiar de esteróis, sendo, inclusive, utilizada para detectar adulterações através da adição de outros óleos. De modo geral, azeites de oliva refinados ou óleos de bagaço apresentam maiores teores de esteróis (ANTONIASSI, 1998).

Segundo León-camacho (2004), a determinação específica de esteróis como estigmastadienos e a relação de estigmasta-3,5-dieno, e campesta-3,5-dieno podem caracterizar uma amostra como azeite refinado, a qual passou por processos de aquecimento e descolorimento. Tais esteróides não estão presentes no azeite de oliva virgem. Sua formação é o resultado da desidratação do β -sitosterol durante o refino de óleos.

A análise de ácidos graxos saturados provenientes do carbono 2 de triacilgliceróis tem como base a presença constante de ácidos graxos insaturados na posição citada. Tal afirmação é correta quando são analisadas amostras de azeites de oliva virgens intactos. Óleos reesterificados, por sua vez, podem apresentar cadeias de ácidos graxos saturados. Independente das amostras, as determinações instrumentais são comumente realizadas através de Cromatografia Gasosa (VOSSEN, 2010).

A determinação da matéria insaponificável é uma técnica onde o azeite de oliva é submetido a uma hidrólise básica e o conteúdo não hidrolisado é determinado. O azeite de oliva elaborado via prensagem apresenta uma composição de matéria insaponificável significativamente diferente da correspondente ao óleo de oliva extraído por solvente. A diferença citada se deve à quantidade maior de cêras e de álcoois triterpênicos (eritrodiol e uvaol) presentes no óleo de oliva extraído por solvente (AMELOTTI, 1984).

Outro perfil importante com relação à determinação da matéria insaponificável é a diferenciação entre óleos extraídos com solventes a frio e a quente. A extração a quente apresenta maior teor de matéria insaponificável já que obtém maiores quantidades de álcoois triterpênicos.

A análise específica de cêras, eritrodiol e uvaol através de Cromatografia Gasosa pode identificar a presença de óleo de bagaço de oliva no azeite de oliva, pois tais substâncias são muito comuns na casca das frutas.

Processos de refino podem eliminar parte dos alcoóis triterpênicos. Entretanto, graças ao maior teor de cêras, estas permanecem facilmente nos óleos de bagaço. Alguns óleos de extração secundária, óleo de bagaço de oliva refinado e óleo de bagaço de oliva bruto podem exceder os limites determinados pela legislação (AUED-PIMENTEL, 2008).

Considerando especificamente o teor de ácidos graxos, livres e esterificados, o COI (2008) determina os limites evidenciados na Tabela 2.

Os ácidos graxos constituem as unidades básicas da maioria dos lipídeos e sua determinação é fundamental para o conhecimento da qualidade dos óleos, para a verificação do efeito de processamentos, adequação nutricional do lipídeo ou do alimento que o contém (MACHADO, 2006).

A análise de composição de ácidos graxos pode evidenciar perfis de variedades e de regiões de produção. Além disso, pode diferenciar óleos de sementes de azeite de oliva. As porcentagens dos constituintes básicos de ácidos graxos são bem documentadas para cada óleo (ZENEBO, 2008).

O azeite de oliva, por ser um alimento rico em ácidos graxos insaturados como os ácidos oleico, linoleico e linolênico, é suscetível à rancificação oxidativa, sendo o número de insaturações um fator determinante para a velocidade da reação. A oxidação dos ácidos graxos insaturados produz diversas substâncias potencialmente tóxicas, entre elas aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos (Figura 14).

Outra característica vinculada às cadeias de ácidos graxos é sua capacidade de sofrer alteração na configuração *cis* gerando isômeros *trans*. Esta conversão isomérica pode ocorrer conforme os azeites são expostos ao calor e/ou altas pressões (REDAS, 2007).

Tabela 2: Composição de ácidos graxos no azeite de oliva.

| Ácido graxo | Nomenclatura | Teor (m/m) |
|---------------------------|--------------|------------|
| 14:0 | mirístico | ≤ 0,05 |
| 16:0 | palmítico | 7,5 a 20,0 |
| 16:1 Δ⁹ | palmitoléico | 0,3 a 3,5 |

| | | |
|----------------------------------|----------------|-------------|
| 17:0 | margárico | ≤ 0,3 |
| 17:1 Δ⁹ | heptadecenóico | ≤ 0,3 |
| 18:0 | estearíco | 0,5 a 5,0 |
| 18:1 Δ⁹ | oléico | 55,0 a 83,0 |
| 18:2 Δ^{9,12} | linoléico | 3,5 a 21,0 |
| 18:3 Δ^{9, 12,15} | linolênico | ≤ 1,0 |
| 20:0 | araquídico | ≤ 0,6 |
| 20:1 Δ⁹ | eicosenóico | ≤ 0,4 |
| 22:0 | behênico | ≤ 0,2* |
| 24:0 | lignocérico | ≤ 0,2 |

*Óleo de bagaço de oliva: < 0,3

Fonte: COI (2008)

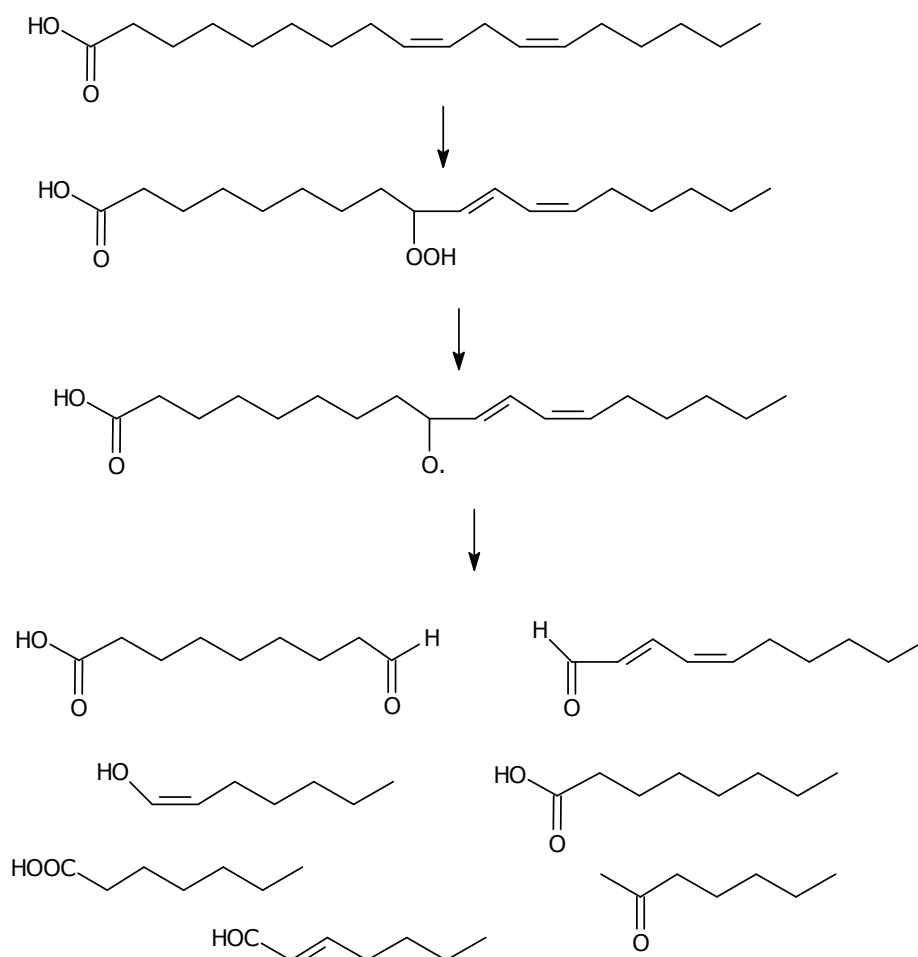


Figura 14 – Decomposição oxidativa do ácido linoléico.
 Fonte: Adaptado de KESLER et al (2000).

2.7 Adultrações

A baixa qualidade de azeites de oliva geralmente está associada a processos de fabricação inadequados. Como consequência, pode-se verificar a presença de produtos comerciais que são impróprios para o consumo. Outra forma de adultração está relacionada a misturas com outros tipos de óleos, cujo produto final se descaracteriza como azeite de oliva (CARDOSO, 2006).

A complexidade que envolve a composição dos diferentes tipos de azeite de oliva, bem como as consequências dos processos de refino, hidrogenação e reesterificação torna a detecção da adultração, muitas vezes, um problema de difícil solução. Por isso, vários índices são recomendados para a verificação da qualidade e da pureza do azeite de oliva (PEIXOTO, 1998).

Aued-Pimentel (2008) relata que a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial ao azeite de oliva é a forma mais comum de adultração. Isto ocorre principalmente quando o azeite é enlatado no Brasil.

Tendo em vista a variedade de óleos derivados das azeitonas, outro perfil de adultração é a classificação inadequada ao processo de fabricação do azeite de oliva extra virgem. Assim, azeites e óleos variados passam a ser comercializados inadequadamente como azeites de oliva extravirgem.

Szpiz et al (1985) identificaram adultrações em amostras de azeite de oliva comerciais em um estudo realizado no Rio de Janeiro (RJ). De cinco amostras distintas, apenas uma apresentou perfil de ácidos graxos característico de azeite de oliva. As demais mostraram desvios na composição de ácidos graxos. Três amostras apresentaram um teor alto de ácidos graxos de baixo peso molecular, o que representa uma possível mistura com óleo de côco ou babaçu. Por sua vez, a amostra restante mostrou grande diferença nos teores de ácido oléico e linoléico, o que sugere uma mistura com óleo de soja.

Em uma avaliação promovida pelo Inmetro (2000), de vinte marcas importadas de azeite de oliva vendidas no Brasil, foram identificadas três marcas com perfis inadequados. Segundo o estudo, os resultados demonstraram a adição de outros óleos vegetais ao azeite de oliva.

Um estudo sobre a incidência de adultrações de azeite de oliva no período

de 1993 a 2000 foi realizado pelo Instituto Adolfo Lutz. Foi verificado que alguns azeites envasados no Brasil e na Argentina apresentavam alterações com óleo de soja, girassol e até com gordura hidrogenada, apesar de raro foi encontrado. Foi determinada a composição de ácidos graxos pelo uso de padrões puros de éster metílico dos ácidos graxos para verificar a presença de outros óleos vegetais na mistura. Também realizaram medidas da absorção do espectro ultravioleta em 232 e 270 nm, as quais forneceram informações para diferenciar as categorias de azeite virgem, puro e refinado. Os autores ressaltaram que os parâmetros utilizados na avaliação dos azeites não são suficientes para assegurar a qualidade e identidade, somente é possível detectar fraudes grosseiras (AUED-PIMENTEL et al; 2002).

2.8 Determinação de ácidos graxos em óleos e azeites

Entre os métodos instrumentais empregados na identificação e na quantificação de ácidos graxos em azeite de oliva, a Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama (CG-DIC) tem sido considerada uma técnica prática e de alta precisão (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), apesar de não necessitar das etapas de hidrólise e reesterificação durante o preparo das amostras, tem sido menos usada por se tratar de uma técnica de operação mais complexa (AUED-PIMENTEL, 2008).

As estratégias de quantificação dos ácidos graxos em óleos e azeites, via CG-DIC, comumente usadas são: a) normalização, b) normalização com fatores de correção e c) normalização com cálculo de padrão interno (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

2.8.1 Normalização

A normalização clássica é um método que considera todos os componentes da amostra volatilizáveis e, como consequência, capazes de serem identificados no cromatograma. No caso específico de óleos vegetais, considera-se que todos os picos do cromatograma sejam os ácidos graxos derivados em ésteres metílicos. Assim, a soma das áreas dos picos dos cromatogramas será usada como referência (100%).

Quando não estão presentes quantidades significativas de componentes com menos de 12 átomos de carbono, calcula-se a porcentagem de área do pico correspondente ao constituinte, em relação à soma das áreas de todos os picos. O resultado será expresso como porcentagem do componente em questão na mistura de ácidos graxos esterificados (% m/m), como mostra a equação (1).

$$T = (A_i/A_T) \times 100\% \quad \begin{array}{l} T = \text{teor do ácido graxo esterificado (\% m/m)} \\ A_i = \text{área do pico} \\ A_T = \text{soma das áreas dos picos} \end{array} \quad (1)$$

2.8.2 Normalização com fatores de correção

O emprego de fatores de correção é realizado quando a amostra contém ácidos graxos com menos de 12 carbonos, com grupos secundários ou, ainda, quando se utiliza um detector de condutividade térmica.

Estes fatores devem ser usados para corrigir discrepâncias entre as porcentagens de área dos picos e a porcentagem de massa dos respectivos componentes. Determina-se os fatores de correção através dos dados de um cromatograma da mistura de padrões de ésteres metílicos, de composição conhecida, nas mesmas condições de análise da amostra.

O teor de ácidos graxos esterificados pode ser expresso na forma da equação (1) e da equação (2):

$$T = (m_i/m_T) \times 100\% \quad \begin{array}{l} T = \text{teor do ácido graxo esterificado (\% m/m)} \\ m_i = \text{massa do ácido graxo esterificado} \\ m_T = \text{soma das massas dos ác. graxos esterificados} \end{array} \quad (2)$$

Ao dividir a equação (2) pela equação (1), tem-se o fator de correção do composto em questão, representado na equação (3):

$$K_i = (m_i \times A_T) / (A_i \times m_T) \quad \begin{array}{l} k_i = \text{fator de correção} \\ m_i = \text{massa do ácido graxo esterificado} \\ m_T = \text{soma das massas dos ác. graxos esterificados} \\ A_i = \text{área do pico} \\ A_T = \text{soma das áreas dos picos} \end{array} \quad (3)$$

Na prática, as determinações de ácidos graxos esterificados utilizam o fator de correção relativo ao ácido palmítico esterificado, como evidenciado na equação (4):

$$k'_i = k_i/k_{C16} \quad \begin{array}{l} k'_i = \text{fator de correção relativo} \\ k_i = \text{fator de correção} \\ k_{C16} = \text{fator de correção do ácido palmítico esterificado} \end{array} \quad (4)$$

Assim, a determinação do teor dos ácidos graxos esterificados passa a ser realizada de acordo com a equação (5):

$$T = \frac{(k'_i \times A_i)}{\sum(k'_i \times A_i)} \times 100\%$$

T = teor de ácido graxo esterificado (% m/m)
 k'_i = fator de correção relativo do ácido graxo esterificado
 A_i = área do pico do ácido graxo esterificado
 Σ(k'_i x A_i) = soma do produto entre os fatores de correção relativos dos ácidos graxos esterificados e suas respectivas áreas

A normalização com fatores de correção pode ser empregada em CG-DIC, sendo a determinação do fator de correção (k_i) realizada de acordo com a equação (6):

$$k_i = \frac{MM_i}{(n_i - 1) \times 12,01}$$

k_i = fator de correção do ácido graxo esterificado
 MM_i = massa molecular do ácido graxo esterificado
 n_i = número de carbonos do ácido graxo esterificado

A determinação dos fatores de correção de resposta do DIC é especialmente importante para os ácidos graxos de baixo peso molecular (C4:0; C6:0), como por exemplo, para os derivados de gordura de leite.

2.8.3 Normalização com cálculo de padrão interno

O método de normalização com cálculo de padrão interno é utilizado para determinar o valor absoluto de um ácido graxo em uma amostra ou para a quantificação de ácidos graxos com baixa massa molecular (4 a 6 carbonos) em meio a ácidos graxos de alta massa molecular (16 a 24 carbonos). Ésteres metílicos de ácidos graxos com número ímpar de carbonos são freqüentemente usados como padrão interno.

De acordo com Visentainer (2006), um padrão interno ideal deve apresentar os seguintes requisitos: a) não ser encontrado na amostra, b) apresentar alto grau de pureza, c) a massa adicionada deve ser precisa, d) ser adicionado em concentrações similares aos componentes a serem analisados, e) apresentar boa estabilidade, f) eluir separadamente e próximo dos componentes da amostra e g) apresentar resposta do detector similar aos componentes da amostra.

Assim, o teor de um ácido graxo esterificado passa a ser determinado de acordo com a equação (7):

$$T = \frac{(m_{pi} \times k'_i \times 100 \times A_i)}{(m \times k'_{pi} \times A_{pi})}$$

T = massa do ácido graxo esterificado por 100g de amostra (% m/m)
 m_{pi} = massa do padrão interno (mg)
 k'_i = fator de correção do ácido graxo esterificado para CG-DIC, relativo ao ácido palmítico
 A_i = área do pico do ácido graxo esterificado
 m = massa da amostra (mg)
 k'_{pi} = fator de correção do padrão interno para CG-DIC, relativo ao ácido palmítico
 A_{pi} = área do pico do padrão interno

Por fim, para o resultado ser expresso como massa de ácido graxo por 100g de amostra, deve-se multiplicar o resultado da equação (7), pelo fator de correção 0,956, equivalente à contribuição de massa dos ácidos graxos nos triacilgliceróis. Tal conversão pode ser observada na equação (8):

$$\mathbf{T_f = T \times 0,956}$$

T_f = massa do ácido graxo por 100g de amostra (% m/m) (8)
 T = massa do ácido graxo esterificado por 100g de amostra (% m/m)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais sobre o trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA. O Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar - LACQSA é uma das unidades laboratoriais do LANAGRO-MG. O Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) tem como objetivo promover o suporte laboratorial aos programas, ações e políticas de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, com confiabilidade e credibilidade analítica para garantir a segurança e qualidade dos insumos agropecuários, dos produtos, subprodutos e derivados de origem animal e vegetal, o controle dos resíduos e contaminantes em produtos de origem animal e vegetal e o controle de doenças visando segurança e competitividade na produção de aves, bovinos, suínos e outros. O LANAGRO está subordinado à Coordenação Geral de Laboratórios – CGAL da Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA (BRASIL, 2005).

3.2 Aquisição e registro das amostras

Foram adquiridas cinco amostras de azeite de oliva extra virgem. Tais amostras foram compradas nas cidades de Belo Horizonte (MG) e Contagem (MG). Em seguida, as 5 amostras foram registradas de acordo com o procedimento interno do LACQSA/LANAGRO-MG (anotação dos dados da amostra (fabricação, validade, lote, procedência) e numeração da amostra conforme o padrão estabelecido pelo laboratório). Por fim, os rótulos de cada embalagem foram retirados com a finalidade de evitar a correlação entre resultados.

3.3 Preparo das amostras

As amostras de azeite de oliva extra virgem foram esterificadas segundo a metodologia da AOCS (2002), cuja descrição se segue: inicialmente foram medidos 250 mg da amostra em um balão de fundo chato de 250 mL, seguido da adição de 4 mL de hidróxido de sódio 0,5N. A mistura foi aquecida em banho maria com refluxo até a solubilização completa da

amostra (5 a 10 minutos). Posteriormente, adicionou-se 5 mL da solução de BF_3 em metanol 14%, sendo a mistura aquecida por 2 minutos. Após o aquecimento, adicionou-se 2 mL de hexano à mistura, sendo esta mantida em ebulição por mais 1 minuto.

Após as etapas de hidrólise e esterificação, resfriou-se a mistura, a qual recebeu 15 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Agitou-se vigorosamente o sistema bifásico até que a fase hexânica ficasse evidente como camada superior. Por fim, transferiu-se a camada hexânica para um tubo de ensaio contendo sulfato de sódio anidro.

A fração hexânica final corresponde à amostra a ser analisada no CG-DIC. O mesmo procedimento, excetuando-se a amostra de azeite de oliva extravirgem, foi realizada para a amostra de referência (branco).

3.4 Condições cromatográficas

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC), injetor split, razão 1:80 e coluna capilar de sílica fundida Supelco 2340 (30m x 0,25mm). As condições cromatográficas empregadas foram: 100°C (1 min)/(6°C/min)/180°C (5 min)/(3°C/min)/220°C (28 min). O tempo total da corrida foi de 60 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo igual a 1,20 mL/min. Por fim, o detector e o injetor foram mantidos a 230°C durante as análises.

3.5 Identificação e quantificação dos ácidos graxos

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação entre o tempo de retenção dos padrões de ácidos graxos e o tempo de retenção dos picos das amostras de azeite de oliva extra virgem. Para tanto, as amostras e a mistura padrão (Supelco, 077SP FAME-Mix) foram injetadas em duplicata e os tempos de retenção obtidos através da média aritmética.

Os ácidos graxos identificados e, posteriormente quantificados, foram: 16:0, 16:1 Δ^9 , 17:0, 17:1 Δ^9 , 18:0, 18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$, 20:0, 22:0 e 23:0.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada através das técnicas de normalização clássica e de normalização com cálculo de fator de correção,

sendo cada amostra preparada em triplicata (3 esterificações) e cada esterificação analisada em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil das amostras

Os 5 produtos comerciais tomados como amostras de azeite de oliva extra virgem foram fabricados em países como Portugal e Espanha, estando as demais características disponibilizadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características das amostras de azeite de oliva extra virgem.

| Amostras* | Nacionalidade | Local de envase | Validade |
|------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
| A | Portuguesa | Portugal | 01/2011 |
| B | Espanhola | Brasil | 12/2012 |
| C | Espanhola | Espanha | 09/2011 |
| D | Portuguesa | Portugal | 02/2011 |
| E | Espanhola | Não informado | 09/2011 |

*As marcas comerciais foram omitidas para preservar as empresas envolvidas.

4.2 Identificação dos ácidos graxos

As amostras de azeite de oliva foram analisadas e os respectivos valores de tempo de retenção dos picos foram comparados com os tempos de retenção dos padrões de ácidos graxos esterificados. Para tanto, cada amostra e a mistura de padrões foram preparadas em duplicata. Os resultados das análises podem ser observados na Tabela 4.

A técnica comparativa foi empregada, pois o detector de ionização de chama (DIC) não permite a identificação seletiva dos compostos eluídos no cromatógrafo.

RIBANI et al (2004) sugerem, entre outras técnicas, o emprego de espectrometria de massas ou de arranjo de diodos para a confirmação dos componentes de uma amostra. Entretanto, tais técnicas apresentam limitações práticas como o custo de aquisição (espectrometria de massas) e o perfil da amostra (arranjo de diodos para compostos que não apresentam espectro de ultravioleta diferenciados), desta forma não acessíveis ao presente trabalho.

Tabela 4: Comparação entre os tempos de retenção dos componentes das amostras e dos padrões de ácidos graxos esterificados.

| Padrões de ésteres graxos | | | | Amostra A | | | Amostra B | | | Amostra C | | | Amostra D | | | Amostra E | | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Padrão | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} | t _{R1} | t _{R2} | t _{Rm} |
| 14:0 | 16,51 | 16,49 | 16,50 | - | - | - | 16,94 | 16,94 | 16,94 | - | - | - | - | - | - | 16,95 | 16,95 | 16,95 |
| 16:0 | 19,76 | 19,75 | 19,75 | 20,33 | 20,33 | 20,33 | 20,36 | 20,36 | 20,36 | 20,35 | 20,36 | 20,36 | 20,32 | 20,31 | 20,31 | 20,36 | 20,36 | 20,36 |
| 16:1 Δ ⁹ | 20,99 | 20,96 | 20,97 | 21,51 | 21,50 | 21,51 | 21,52 | 21,52 | 21,52 | 21,50 | 21,51 | 21,51 | 21,49 | 21,49 | 21,49 | 21,53 | 21,53 | 21,53 |
| 17:0 | 21,57 | 21,54 | 21,56 | 22,12 | 22,11 | 22,12 | 22,13 | 22,14 | 22,14 | 22,10 | 22,11 | 22,10 | 22,10 | 22,10 | 22,09 | 22,14 | 22,14 | 22,14 |
| 17:1 Δ ⁹ | 22,88 | 22,84 | 22,85 | 23,31 | 23,32 | 23,31 | 23,33 | 23,33 | 23,33 | 23,30 | 23,31 | 23,31 | 23,30 | 23,30 | 23,30 | 23,32 | 23,34 | 23,33 |
| 18:0 | 23,49 | 23,46 | 23,48 | 24,24 | 24,26 | 24,25 | 24,24 | 24,25 | 24,25 | 24,33 | 24,34 | 24,34 | 24,20 | 24,20 | 24,20 | 24,22 | 24,21 | 24,22 |
| 18:1 Δ ⁹ | 24,66 | 24,64 | 24,65 | 25,49 | 25,51 | 25,50 | 25,40 | 25,41 | 25,40 | 25,61 | 25,62 | 25,62 | 25,46 | 25,45 | 25,46 | 25,39 | 25,38 | 25,38 |
| 18:2 Δ ^{9,12} | 26,53 | 26,50 | 26,52 | 27,16 | 27,17 | 27,17 | 27,31 | 27,33 | 27,32 | 27,18 | 27,19 | 27,18 | 27,14 | 27,14 | 27,14 | 27,29 | 27,29 | 27,29 |
| 18:2 Δ ^{9,12} trans | 25,71 | 25,69 | 25,70 | - | - | - | 26,82 | 26,82 | 26,82 | - | - | - | - | - | - | 26,80 | 26,80 | 26,80 |
| 18:3 Δ ^{9,12,15} | 28,93 | 28,90 | 28,92 | 29,33 | 29,33 | 29,33 | 29,39 | 29,39 | 29,39 | 29,34 | 29,35 | 29,35 | 29,32 | 29,32 | 29,32 | 29,38 | 29,39 | 29,38 |
| 18:3 Δ ^{6,9,12} | 27,95 | 27,92 | 27,93 | - | - | - | 28,68 | 28,69 | 28,69 | - | - | - | - | - | - | 28,69 | 28,69 | 28,68 |
| 20:0 | 27,52 | 27,49 | 27,51 | 28,15 | 28,16 | 28,16 | 28,17 | 28,18 | 28,18 | 28,13 | 28,14 | 28,14 | 28,12 | 28,12 | 28,12 | 28,17 | 28,18 | 28,17 |
| 20:1 Δ ⁹ | 28,73 | 28,70 | 28,72 | - | - | - | 29,14 | 29,14 | 29,14 | - | - | - | - | - | - | 29,13 | 29,14 | 29,14 |
| 22:0 | 31,61 | 31,58 | 31,59 | 32,29 | 32,28 | 32,29 | 32,31 | 32,31 | 32,31 | 32,23 | 32,24 | 32,23 | 32,25 | 32,25 | 32,25 | 32,30 | 32,31 | 32,31 |
| 23:0 | 33,61 | 33,58 | 33,59 | 34,61 | 34,62 | 34,62 | - | - | - | 34,48 | 34,49 | 34,49 | 34,53 | 34,53 | 34,53 | - | - | - |
| 24:0 | 35,79 | 35,76 | 35,78 | - | - | - | - | - | - | 36,57 | 35,58 | 36,57 | 36,61 | 36,61 | 36,61 | 36,67 | 36,67 | 36,67 |

t_{R1}: tempo de retenção da análise 1 (min)

t_{R2}: tempo de retenção da análise 2 (min)

t_{Rm}: tempo de retenção médio (min)

Visentainer e Franco (2006) sugerem outras duas técnicas para a identificação de ácidos graxos através da CG-DIC: Índice de Kovats e a determinação do Comprimento Equivalente da Cadeia (CEC). A técnica do Índice de Kovats emprega uma solução composta por uma mistura de padrões de alcanos: nonano (C₉), decano (C₁₀), dodecano (C₁₂), tetradecano (C₁₄), hexadecano (C₁₆), octadecano (C₁₈), eicosano (C₂₀), docosano (C₂₂), tetracosano (C₂₄), entre outros. A mistura padrão é inserida na amostra que, após a análise, apresentará um cromatograma cujos picos da amostra ficam localizados entre os picos dos alcanos. Em seguida, os dados de cada componente da amostra são tratados através da equação (9) e cada pico passa a ter seu Índice de Kovats. Por fim, os Índices de Kovats são comparados com valores tabelados para a identificação dos componentes da amostra.

$$I = 100 \times [n_a + ((100 \log tr_i) - \log tr_a) / (\log tr_p - \log tr_a)] \quad (9)$$

tr_i = tempo de retenção corrigido do componente de interesse
 tr_a = tempo de retenção corrigido do alcano eluído antes do componente de interesse
 tr_p = tempo de retenção corrigido do alcano eluído após o componente de interesse
 n_a = número de carbonos do alcano eluído antes do composto de interesse

A determinação do CEC, por sua vez, faz uso de uma mistura padrão de ácidos carboxílicos saturados e os valores de tempo de retenção são inseridos na equação (10) (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

$$CEC = n + (2 \times (\log tr_x - \log tr_n)) / (\log tr_{n+2} - \log tr_n) \quad (10)$$

n = número de átomos de carbono do ácido graxo eluído antes do composto de interesse
 tr_x = tempo de retenção do composto de interesse
 tr_n = tempo de retenção do ácido graxo eluído antes do composto de interesse
 tr_{n+2} = tempo de retenção do ácido graxo eluído após o composto de interesse

As técnicas citadas não foram empregadas, pois não se dispunha da mistura padrão de alcanos e a mistura de ácidos graxos esterificados (Supelco, 077SP FAME-Mix) apresentava 37 padrões em mistura, com concentrações variadas. Assim, o tempo de análise e o condicionamento do cromatógrafo demandaram muito tempo, além de ser necessária a reinjeção da amostra para adequar a quantidade de massa injetada (padrões muito concentrados não reproduzem seus tempos de retenção).

4.3 Quantificação dos ácidos graxos e avaliação das amostras comerciais de azeite de oliva extra virgem

As 5 amostras comerciais de azeite de oliva extra virgem foram analisadas e os ácidos graxos quantificados através das técnicas de normalização clássica e de normalização com cálculo de fator de correção. Os resultados foram comparados com as faixas preconizadas pela legislação para azeites de oliva (COI, 2008) e para óleos de soja (ANVISA, 1999), tendo em vista possíveis adulterações dos azeites com óleo de soja.

Inicialmente realizou-se as análises da amostra A, sendo o cromatograma (Figura 15) e os resultados (Tabela 5) evidenciados a seguir.

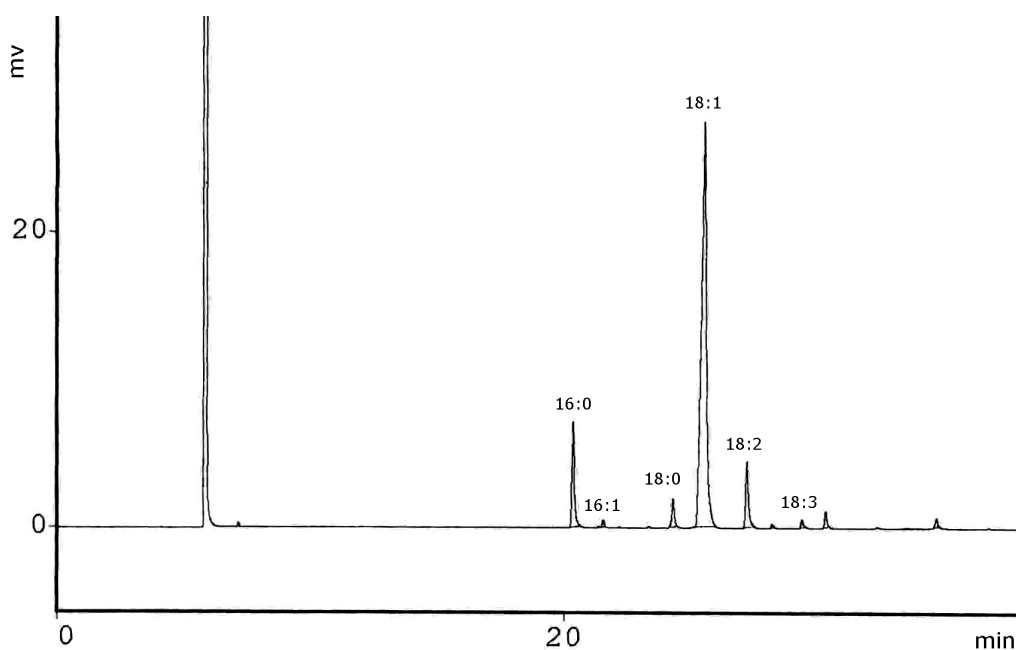


Figura 15: Cromatograma da amostra A.

Tabela 5: Teor de ácidos graxos na amostra A via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

| Ácido graxo | Teor (% m/m ácidos graxos esterificados)* | | | |
|---------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| | Faixa permitida para azeite de oliva (COI, 2008) | Faixa permitida para óleo de soja (ANVISA, 1999) | Média dos teores via normalização | Média dos teores via normalização com cálculo do fator de correção |
| 16:0 | 7,5 - 20 | 7,0 - 14,0 | 9,85 ± 0,06 | 10,09 ± 0,06 |
| 16:1 Δ⁹ | 0,3 - 3,5 | < 0,5 | 0,58 ± 0,01 | 0,59 ± 0,01 |
| 17:0 | ≤ 0,3 | - | 0,07 ± 0,03 | 0,07 ± 0,03 |
| 17:1 Δ⁹ | ≤ 0,3 | - | 0,12 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 |
| 18:0 | 0,5 - 5,0 | 1,4 - 5,5 | 2,94 ± 0,01 | 2,95 ± 0,01 |

| | | | | |
|---|-------------|-------------|------------------|------------------|
| 18:1 Δ^9 | 55,0 - 83,0 | 19,0 - 30,0 | 77,00 \pm 0,01 | 76,85 \pm 0,01 |
| 18:2 $\Delta^{9,12}$ | 3,5 - 21,0 | 44,0 - 62,0 | 7,18 \pm 0,01 | 7,12 \pm 0,01 |
| 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ | \leq 1,0 | 4,0 - 11,0 | 0,79 \pm 0,01 | 0,78 \pm 0,01 |
| 20:0 | \leq 0,6 | < 1,0 | 0,33 \pm 0,01 | 0,33 \pm 0,01 |
| 22:0 | \leq 0,2 | < 0,5 | 0,07 \pm 0,01 | 0,07 \pm 0,01 |
| 23:0 | - | - | 1,08 \pm 0,08 | 1,04 \pm 0,08 |

*Análises realizadas em triplicata

Após a análise dos resultados pôde-se perceber uma similaridade entre os valores das técnicas de normalização e de normalização com cálculo do fator de correção. Tal comportamento pode ser atribuído à ausência de ácidos graxos de cadeia curta, como mencionado por (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

Ao avaliar os resultados e compará-los com as faixas de teores preconizadas pela legislação, pode-se verificar que a amostra A contém ácidos graxos cujos teores se adequam ao perfil de azeites de oliva, ou seja, de produto comercial não adulterado.

Em seguida realizou-se as análises da amostra B, sendo o cromatograma (Figura 16) e os resultados (Tabela 6) disponibilizados a seguir.

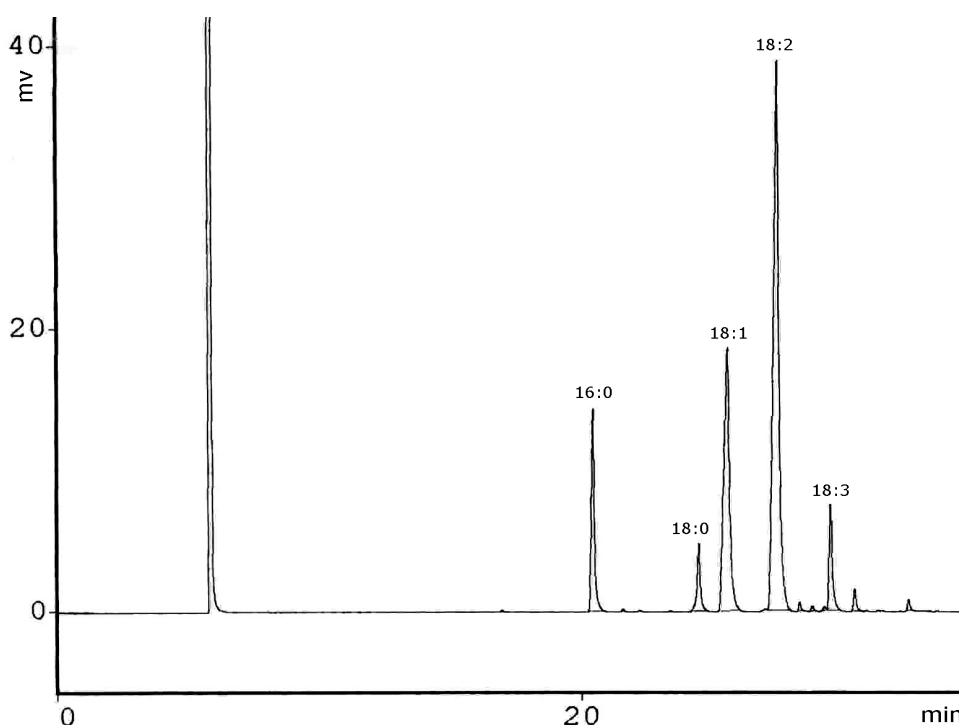


Figura 16: Cromatograma da amostra B.

Tabela 6: Teor de ácidos graxos na amostra B via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

| Ácido graxo | Teor (% m/m ácidos graxos esterificados)* | | | |
|------------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| | Faixa permitida para azeite de oliva (COI, 2008) | Faixa permitida para óleo de soja (ANVISA, 1999) | Média dos teores via normalização | Média dos teores via normalização com cálculo do fator de correção |
| 14:0 | ≤ 0,05 | < 0,5 | 0,05 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 |
| 16:0 | 7,5 - 20 | 7,0 - 14,0 | 10,77 ± 0,05 | 11,06 ± 0,05 |
| 16:1 Δ⁹ | 0,3 - 3,5 | < 0,5 | 0,09 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 |
| 17:0 | ≤ 0,3 | - | 0,08 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 |
| 17:1 Δ⁹ | ≤ 0,3 | - | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| 18:0 | 0,5 - 5,0 | 1,4 - 5,5 | 3,81 ± 0,05 | 3,85 ± 0,05 |
| 18:1 Δ⁹ | 55,0 - 83,0 | 19,0 - 30,0 | 26,15 ± 0,13 | 26,18 ± 0,13 |
| 18:2 Δ^{9,12} trans | - | - | 0,11 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 |
| 18:2 Δ^{9,12} | 3,5 - 21,0 | 44,0 - 62,0 | 51,89 ± 0,15 | 51,61 ± 0,15 |
| 18:3 Δ^{6, 9,12} | - | - | 0,22 ± 0,02 | 0,21 ± 0,02 |
| 18:3 Δ^{9, 12,15} | ≤ 1,0 | 4,0 - 11,0 | 5,93 ± 0,03 | 5,86 ± 0,03 |
| 20:0 | ≤ 0,6 | < 1,0 | 0,32 ± 0,03 | 0,32 ± 0,03 |
| 20:1 Δ⁹ | - | < 1,0 | 0,16 ± 0,04 | 0,16 ± 0,04 |
| 22:0 | ≤ 0,2 | < 0,5 | 0,42 ± 0,05 | 0,41 ± 0,05 |

*Análises realizadas em triplicata

Os resultados das análises da amostra B evidenciaram ácidos graxos cuja concentração não se adequou às faixas estabelecidas pela legislação para azeites de oliva (COI, 2008): 16:1 Δ⁹, 18:1 Δ⁹, 18:2 Δ^{9,12}, 18:3 Δ^{9,12,15} e 20:0. Quando os teores são comparados com as faixas permitidas para óleo de soja pode-se observar completa concordância dos resultados. Assim, a amostra B se comporta como uma adulteração de azeite de oliva com óleo de soja ou simplesmente como óleo de soja envasado como azeite de oliva.

Outra característica importante relativa à amostra B foi a similaridade dos resultados via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

A seguir o cromatograma (Figura 17) e os resultados (Tabela 7) das análises da amostra C.

A amostra C apresentou teores de ácidos graxos dentro dos limites estabelecidos pela legislação para azeites de oliva comerciais, comportamento similar ao da amostra A. Mais uma vez os valores obtidos via normalização e via normalização com cálculo do fator de correção se mostraram similares.

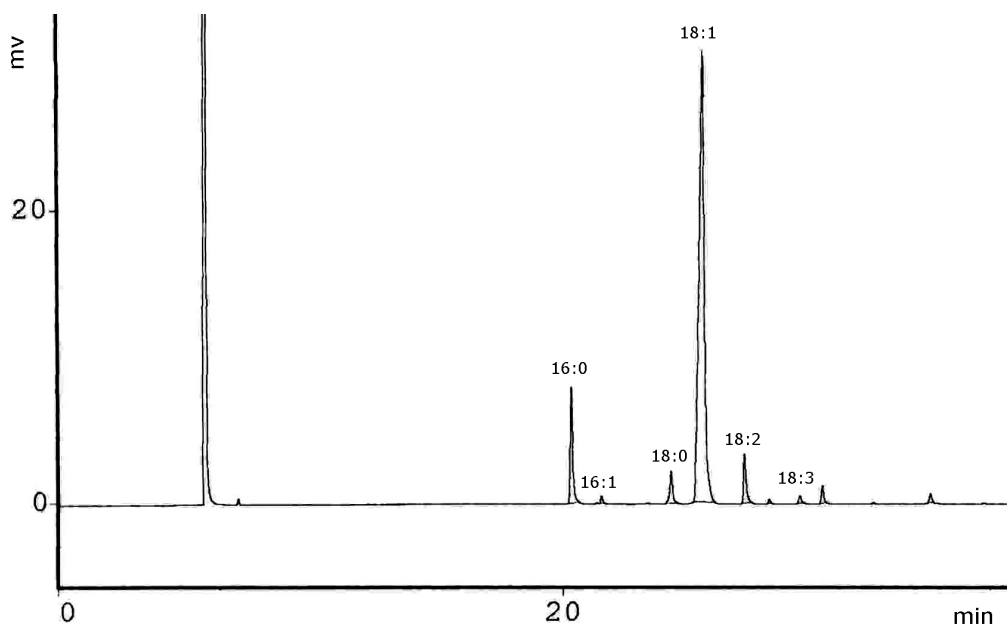


Figura 17: Cromatograma da amostra C.

Tabela 7: Teor de ácidos graxos na amostra C via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

| Ácido graxo | Teor (% m/m ácidos graxos esterificados)* | | | |
|-----------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| | Faixa permitida para azeite de oliva (COI, 2008) | Faixa permitida para óleo de soja (ANVISA, 1999) | Média dos teores via normalização | Média dos teores via normalização com cálculo do fator de correção |
| 16:0 | 7,5 - 20 | 7,0 - 14,0 | 9,80 ± 0,13 | 10,04 ± 0,13 |
| 16:1 Δ ⁹ | 0,3 - 3,5 | < 0,5 | 0,55 ± 0,01 | 0,56 ± 0,01 |
| 17:0 | ≤ 0,3 | - | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| 17:1 Δ ⁹ | ≤ 0,3 | - | 0,06 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 |
| 18:0 | 0,5 - 5,0 | 1,4 - 5,5 | 3,19 ± 0,03 | 3,20 ± 0,03 |
| 18:1 Δ ⁹ | 55,0 - 83,0 | 19,0 - 30,0 | 79,99 ± 0,12 | 79,81 ± 0,12 |
| 18:2 Δ ^{9,12} | 3,5 - 21,0 | 44,0 - 62,0 | 4,48 ± 0,02 | 4,44 ± 0,02 |
| 18:3 Δ ^{9, 12,15} | ≤ 1,0 | 4,0 - 11,0 | 0,75 ± 0,03 | 0,74 ± 0,03 |
| 20:0 | ≤ 0,6 | < 1,0 | 0,32 ± 0,01 | 0,32 ± 0,01 |
| 22:0 | ≤ 0,2 | < 0,5 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 |
| 23:0 | - | - | 0,72 ± 0,16 | 0,70 ± 0,16 |
| 24:0 | - | - | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 |

*Análises realizadas em triplicata

A amostra D, por sua vez, apresentou os resultados disponibilizados na Tabela 8 e seu perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 18.

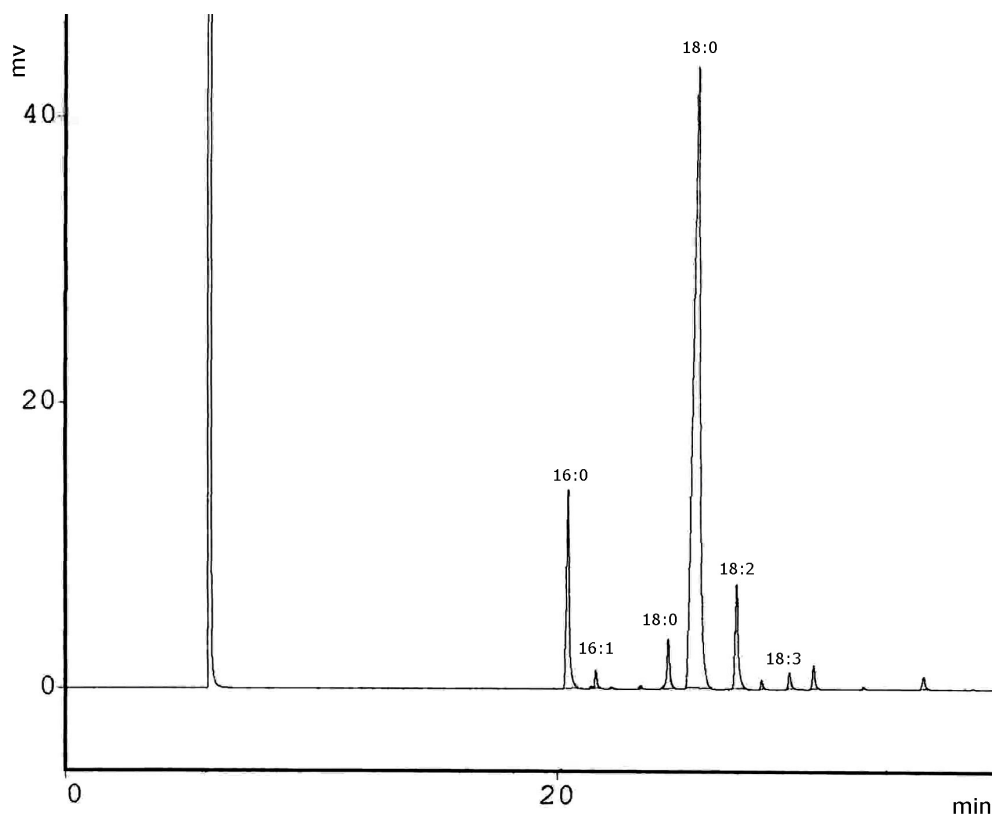


Figura 18: Cromatograma da amostra D.

Tabela 8: Teor de ácidos graxos na amostra D via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

| Ácido graxo | Teor (% m/m ácidos graxos esterificados)* | | | |
|----------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| | Faixa permitida para azeite de oliva (COI, 2008) | Faixa permitida para óleo de soja (ANVISA, 1999) | Média dos teores via normalização | Média dos teores via normalização com cálculo do fator de correção |
| 16:0 | 7,5 - 20 | 7,0 - 14,0 | 10,61 ± 0,09 | 10,86 ± 0,09 |
| 16:1 Δ⁹ | 0,3 - 3,5 | < 0,5 | 0,72 ± 0,04 | 0,72 ± 0,04 |
| 17:0 | ≤ 0,3 | - | 0,06 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 |
| 17:1 Δ⁹ | ≤ 0,3 | - | 0,11 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 |
| 18:0 | 0,5 - 5,0 | 1,4 - 5,5 | 2,67 ± 0,03 | 2,68 ± 0,03 |
| 18:1 Δ⁹ | 55,0 - 83,0 | 19,0 - 30,0 | 77,59 ± 0,18 | 77,34 ± 0,18 |
| 18:2 Δ^{9,12} | 3,5 - 21,0 | 44,0 - 62,0 | 6,29 ± 0,06 | 6,23 ± 0,06 |
| 18:3 Δ^{9, 12,15} | ≤ 1,0 | 4,0 - 11,0 | 0,77 ± 0,06 | 0,76 ± 0,06 |
| 20:0 | ≤ 0,6 | < 1,0 | 0,33 ± 0,03 | 0,33 ± 0,03 |
| 22:0 | ≤ 0,2 | < 0,5 | 0,08 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 |
| 23:0 | - | - | 0,73 ± 0,17 | 0,78 ± 0,17 |
| 24:0 | - | - | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |

*Análises realizadas em triplicata

A amostra D apresentou comportamento similar às amostras A e C, estando os teores de ácidos graxos dentro dos limites estabelecidos pela legislação

para azeites de oliva. Mais uma vez pôde-se observar que as técnicas de normalização e de normalização com cálculo do fator de correção apresentaram resultados similares.

A parte experimental do presente trabalho foi finalizada com as análises da amostra E, sendo o perfil cromatográfico (Figura 19) e os resultados (Tabela 9) evidenciados a seguir.

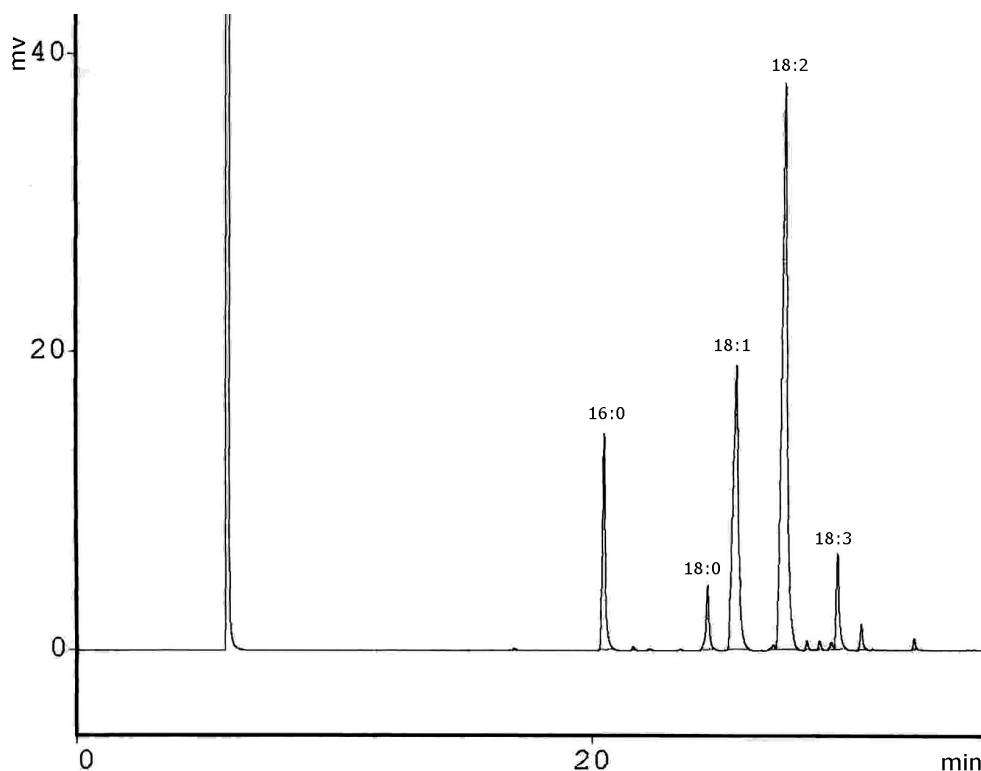


Figura 19: Cromatograma da amostra E.

Tabela 9: Teor de ácidos graxos na amostra E via normalização e normalização com cálculo do fator de correção.

| Ácido graxo | Teor (% m/m ácidos graxos esterificados)* | | | |
|------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| | Faixa permitida para azeite de oliva (COI, 2008) | Faixa permitida para óleo de soja (ANVISA, 1999) | Média dos teores via normalização | Média dos teores via normalização com cálculo do fator de correção |
| 14:0 | ≤ 0,05 | < 0,5 | 0,05 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 |
| 16:0 | 7,5 - 20 | 7,0 - 14,0 | 11,10 ± 0,07 | 11,46 ± 0,07 |
| 16:1 Δ⁹ | 0,3 - 3,5 | < 0,5 | 0,11 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 |
| 17:0 | ≤ 0,3 | - | 0,08 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 |
| 17:1 Δ⁹ | ≤ 0,3 | - | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| 18:0 | 0,5 - 5,0 | 1,4 - 5,5 | 3,42 ± 0,07 | 3,46 ± 0,07 |
| 18:1 Δ⁹ | 55,0 - 83,0 | 19,0 - 30,0 | 26,99 ± 0,25 | 27,27 ± 0,25 |
| 18:2 Δ^{9,12} | - | - | 0,25 ± 0,08 | 0,25 ± 0,08 |

| trans | | | | |
|---|------------|-------------|-------------------------|-------------------------|
| 18:2 $\Delta^{9,12}$ | 3,5 - 21,0 | 44,0 - 62,0 | 51,32 \pm 0,12 | 50,91 \pm 0,12 |
| 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ | - | - | 0,37 \pm 0,03 | 0,37 \pm 0,03 |
| 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ | \leq 1,0 | 4,0 - 11,0 | 5,00 \pm 0,08 | 4,95 \pm 0,08 |
| 20:0 | \leq 0,6 | $<$ 1,0 | 0,29 \pm 0,03 | 0,29 \pm 0,03 |
| 20:1 Δ^9 | - | $<$ 1,0 | 0,30 \pm 0,06 | 0,30 \pm 0,06 |
| 22:0 | \leq 0,2 | $<$ 0,5 | 0,38 \pm 0,05 | 0,38 \pm 0,05 |

*Análises realizadas em triplicata

Assim como na amostra B, pôde-se observar que os ácido graxos 16:1 Δ^9 , 18:1 Δ^9 , 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ e 22:0 não apresentaram teores dentro das faixas preconizadas pela legislação para azeites de oliva. E da mesma forma, tais ácidos graxos apresentaram perfis dentro dos limites das faixas estabelecidas para óleos de soja. Logo, a amostra E também se mostra como uma mistura de azeite de oliva com óleo de soja ou como óleo de soja comercializado como azeite de oliva. Por outro lado, as técnicas de normalização e de normalização com cálculo do fator de correção apresentaram resultados similares.

Após a apresentação e discussão dos resultados das amostras A, B, C, D e E, pôde-se comprovar que azeites de oliva extra virgem comerciais estão sendo disponibilizados aos consumidores como mistura ou como óleo de soja (amostras B e E).

Outra característica importante das amostras B e E foi o local de envase: amostra B envasada no Brasil e amostra E sem o local disponibilizado no rótulo. Como mencionado por Aued-Pimentel (2008), a adição de outros óleos vegetais, de menor valor comercial, ao azeite de oliva é a forma mais comum de adulteração, e isto ocorre principalmente quando o azeite é enlatado no Brasil.

Quando se avalia a nacionalidade dos azeite de oliva, percebe-se que as amostras B e E tem origem espanhola. Entretanto, como a amostragem foi pequena, não se pode afirmar que, de modo geral, os azeites espanhóis comercializados no Brasil são de qualidade duvidosa.

De modo geral, as avaliações acima confirmam a necessidade de elaboração e aprovação de um Regulamento técnico de identidade e qualidade para azeites de oliva, incluindo metodologias analíticas para a implementação deste Regulamento. Desta forma, a partir deste regulamento e da definição

e validação de metodologias analíticas, o MAPA poderá atuar técnica e legalmente na fiscalização da entrada desses produtos no mercado brasileiro (importação) e no comércio interno.

É importante ressaltar que a avaliação do teor de ácidos graxos é apenas uma entre as várias análises consideradas como requisito no controle de qualidade e identidade dos azeites de oliva. Assim, um laudo completo deve levar em conta características como perfil e teor de esteróis, triacilgliceróis *in natura*, etc.

Por fim pôde-se observar que os dois métodos de cálculo (normalização e normalização com fator de correção) fornecem resultados bem similares, já que os ácidos graxos presentes no azeite de oliva têm massas molares bem próximas e a resposta do detector de ionização por chama não é tão discrepante nesses casos. Entretanto quando se deseja resultados mais precisos é aconselhado que se use os fatores de correção para o cálculo da composição de ácidos graxos.

5. CONCLUSÕES

Foi possível realizar a análise de quantificação de ácidos graxos em azeite de oliva extra virgem através dos métodos de normalização clássico e de normalização com cálculo do fator de correção.

Das cinco amostras analisadas, as amostras B e E se mostraram fora dos padrões estabelecidos pela legislação quanto aos teores de ácidos graxos. As amostras citadas apresentaram origem espanhola e sua envase no Brasil ou não identificada.

As adulterações ocorreram provavelmente com adição de óleo de soja, já que sua composição se adéqua aos limites estabelecidos pela legislação para os teores de ácidos graxos.

Portanto, tais características confirmam a necessidade de elaboração e aprovação de um Regulamento técnico de identidade e qualidade para azeites de oliva incluindo metodologias analíticas, para que o MAPA possa atuar técnica e legalmente na fiscalização da entrada desses produtos no mercado brasileiro (importação) e no comércio interno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROSOFT BRASIL. *Epagri: Santa Catarina já pode produzir azeitonas e azeite de oliva*. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/213364.htm>. Acesso em: 21/06/2010.

AMELOTTI, G. *Attualità dei metodi di analisi per la ricerca dell'olio di sansa nell'olio di oliva*. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, v.61, n.3, p.145-150, 1984.

ANTONIASI, R; PEREIRA, D. A, et al. *Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva*. Braz. J. Food Technol, Campinas, v.1, p. 32-43, 1998.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, set. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: jul. 2009

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde. Resolução nº 482 de 16 de abril de 1999. Estabelece padrão de identidade e qualidade para os óleos e gorduras comestíveis, destinados à alimentação humana. Diário Oficial (República Federativa do Brasil), Brasília, 26 abril. 1999. Seção 1, pt1. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm > Acesso set. 2009.

AOCS. *Official Methods of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVEIRA (ABPIC). **Dados de mercado**. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/conhecendo.asp>>. Acesso em: 18 de set. 2009.

AUED-PIMENTEL, S. *Avaliação do grau discriminatório de parâmetros analíticos do azeite de oliva: 1. Aplicação da espectrofotometria derivada*. 1991. 223f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

AUED-PIMENTEL, S. E. TAKEMOTO, et al. *Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000*. Inst. Adolfo Lutz, v.2, n.61, p.69. 2002.

AUED-PIMENTEL, S., E. TAKEMOTO, et al. *Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicérido ecn 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no BRASIL*. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 31-34, 2008.

BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. *El cultivo del olivo*. 2. ed. Madri: Mundi-Prensa-Junta de Andalucía, 1998. 651 p.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U.; *Recomendações para calibração em química analítica - parte i. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)*. Quim. Nova, v. 25, n. 5, p.856-865, 2002.

BENEDICO, E. C.; PÉREZ, C. A.; MARTINEZ, D. S. *Aceite de oliva virgin*:

Qué debe saber el profesional de atención Primaria Centro de Salud: Temas de Hoy Zaragoza-Espanha, Set, p. 391-395. 2002.

BOSKOU, D. Olive oil. mediterranean diets. *Word Review of Nutrition and Diet*, Basel, v. 87, p. 56-77, 2000.

BRASIL- Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - Ministério da Saúde. Resolução nº 22/77 de 6 de setembro de 1977. Estabelece padrão de identidade e qualidade para os óleos e gorduras comestíveis, destinados à alimentação humana. Diário Oficial (República Federativa do Brasil), Brasília, 6 set. 1977. Seção 1, pt 1

CAMPIÑAS DE JAÉN. **Elaboracion de aceites de calidad**, Úbeda 2010. Disponível em: <<http://www.campinasdejaen.es/es/seccion.html?pag=/es/aceite.oliva.html>> acesso em 01, dez. 2009.

CARDOSO, L. G. V. *Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em Minas Gerais –Brasil*. 2006. 68 f. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos) – UFLA. Lavras, 2006.

CODEX Alimentarius Commission. *Codex Standards for olive oils, and olive pomace oils*, CODEX STAN 33, 1981. *Codex Alimentarius*, Rome: FAO/WHO, 2003, rev.2

COI - International Olive Oil Council. *Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive-Pomace Oil*. COI/T.15/NC nº3/Rev.3, nov. 2008. 1-18p.

COI - International Olive Oil Council. **Consummation**, Espanha 2009. Disponível em: < http://www.internationaloliveoil.org/downloads/consommation1_ang.pdf> acesso em 21, dez. 2009a.

COI - International Olive Oil Council. **Imports Brasil**, Espanha 2009. Disponível em: < http://www.internationaloliveoil.org/downloads/Brasil_ang.pdf> acesso em 21, dez. 2009b.

CONTIÑAS, A., S. MARTÍNEZ, et al. *Detección de adulteraciones y/o contaminaciones del aceite de oliva virgen extra con aceites de semillas y aceite de orujo de oliva*. *Grasas y Aceites*, v.2, n.59, p.97-103. 2008.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 1031. 1978.

(EU) - EUROPEAN UNION. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 2568/91 of 11 July 1991. *On the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis*. *Official Journal of the European Communities*. 1991.

INMETRO -Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Análise da qualidade de azeites comercializados no Brasil**. São Paulo, 2000. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/azeite.asp>>. Acesso em:17 set. 2009.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020, 1ª Edição Digital (4ª edição – 2005)<http://www.ial.sp.gov.br>.

- JORGE, R. O, COSTA, V. B., JORGE, Z., SGANZERLA, M., ZAMBIAZI, R.C. *Caracterização físico-química do azeite de oliva das cultivares arbequina, arbosana e koroneiki, produzido na região sul do rio grande do sul*. XVIII CIC e XI ENPOS (mostra científica). 1-4. Acesso internet: março 2010 - www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_02080.pdf
- KIRITSAKIS, A. & MARKAKIS, P. *Olive Oil: A Review*. Advances in Food Research, vol. 31, p.453-483, 1987
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 4ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2007.
- LEÓN-CAMACHO, M.; SERRANO, M. A.; CONSTANTE, E. G. *Formation of stigmasta-3,5-diene in olive oil during deodorization and/or physical refining using nitrogen as stripping gas*. Grasas y Aceites. v. 55. n. 3, p. 227-232, 2004.
- MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. *Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu*. Ceres, Viçosa, p.463-468, Jul./Ago. 2006.
- MARTIN, C. A. et al. *Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos*. Revista de Nutrição, Campinas, p.761-770, nov./dez. 2006.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. *Norma de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do óleo de soja*. 1993. Disponível em: < http://www.pr.gov.br/claspar/pdf/oleosoja795_93.pdf > Acesso em: 02 de jan. 2010.
- OLIVEIRA, A. F. de.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. de A.; PASQUALONE A.; CATALANO, M. *Free and total sterols in olive oils. Effects of neutralization*. Grasas y Aceites, Sevilla, v. 51, n. 3, p. 180- 182, 2000.
- PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. *Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva: Proposta para atualização da legislação brasileira*. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-470, out./dez. 1998.
- PÉREZ-CAMINO, M. C. MARQUEZ-RUIZ, G., DOBARGANES, M. C. *Alteración de grasas usadas em fritura. 1. Comportamento de aceites de oliva, girasol em freidoras domésticas*. Grasas y Aceites. Sevilla, v. 38, n. 5, p. 307 – 317, 1987.
- REDA, S. Y. ; CARNEIRO, P. I. B. *Óleos e gorduras: aplicações e implicações*. Revista Analytica, Ponta Grossa, n. 27, p.64-67, mar.2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLINS, C. H.; JARDIM, C. F. S.; MELO, L. F. C. *Validação em Métodos Cromáticos e Eletroforéticos*. Química Nova, v27, n. 5, 771-780, 2004.
- RANALLI, A.; CABRAS, P.; IANNUCCI, E.; CONTENTO, S. *Lipochromes, vitamins, aromas and other componentes of virgin olive oil are affected by processing technology*. Food Chemistry. Oxford, v. 73, p. 445 – 451, 2001.
- RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; PÉREZ-CAMINO, M. C. *Update on solid-phase*

- extraction for the analysis of lipid classes and related compounds (Review)*. Journal of Chromatography A. Amsterdam, v. 885, p. 321 – 341, 2000.
- SOUZA, F. T.; MARGARITES, et al. *Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e Azeite de oliva*. Alim. Nutr., Araraquara, v.17, n.3, p.275-279, jul./set. 2006.
- SZPIZ, R. R.; PEREIRA, D. A.; JABLONKA, F. H. *Avaliação de óleos comestíveis comercializados no Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1985. 11 p. (EMBRAPA. Boletim de Pesquisa, n. 13).
- UCEDA, M.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G.; *Olive oil extraction and quality*. Grasas y aceites, Espanha, v. 57, p. 25-31, jan./mar 2006.
- VISENTAINER, J. G.; FRANCO, M. R. B. *Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. São Paulo: Editora Varela, 2006.
- VISIOLI, F.; GALLI, C. *Biological properties of olive oil phytochemicals*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v.42, p209-221.2002.
- VOSSSEN, P. **International Olive Oil Council (IOOC) Trade Standard for Olive Oil**. Disponível em < <http://ucanr.org/sitebuilder/display/search.cfm> > Acesso em: 02 jan. 2010.
- ZAMPELAS, A.; KAFATOS, A. G. *Olive oil intake in relation to cardiovascular diseases*. Grasas y Aceites, Athens, v.55, n. 24, p24-32. 2004.
- ZENEBO, O. ; PASCUEST, N. S.; TIGLEA, P. *Óleos e Gorduras. Edição 4. Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, p.614-616, 2008.