



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**QUANTIFICAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM AZEITE DE OLIVA (*OLEA
EUROPAEA*) POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA**

Denise Fabiana Silvestre Becker
(Farmacêutica-Bioquímica)

ORIENTADORA: Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas – SP – Brasil
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B388q Becker, Denise Fabiana Silvestre
Quantificação de fitosteróis em azeite de oliva (*Olea europaea*) por cromatografia em fase gasosa / Denise Fabiana Silvestre Becker. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Azeite de oliva. 2.Adulterações. 3.Cromatografia de gás.
I.Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

**Professora Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(Orientadora)**

**Professora Dra. Helena Teixeira Godoy
(Membro)**

**Dr. Renato Grimaldi
(Membro)**

**Dra. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira
(Membro)**

Dedico,

A minha mãe, Maria Helena, cujo amor, compreensão e dedicação sempre apoiou e incentivou esta conquista.

Aos meus avós Victor e Maria Conceição, e à tia Conceição, que por meio de orações e sábias palavras souberam me confortar nos momentos de grande ansiedade.

Ao meu noivo, Mauricio, pelo companheirismo, paciência, amor e respeito, principalmente nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de ingressar em uma Universidade de conceito e referência internacional, por me conceder saúde, inteligência e paciência para superar as dificuldades com fé e sabedoria.

À professora Dra. Lireny A. G. Gonçalves pela valiosa orientação no desenvolvimento deste trabalho. Pela compreensão e atenção que possui, portando-se não apenas como orientadora, mas como uma amiga.

Ao Dr. Masaharu Ikegaki, professor da EFOA que me apresentou à Unicamp, incentivou e acreditou no meu propósito de fazer pós-graduação.

Ao Dr. Renato Grimaldi pela inestimável colaboração técnico-científica na realização da parte experimental deste trabalho e grande enriquecimento profissional.

À Dra. Thais M. F. S. Vieira, pesquisadora da EMBRAPA/ RJ, pelo apoio e por compartilhar sua experiência nas áreas de conhecimento abordadas neste trabalho.

À Rosana N. C. Moreira, por sua imensa ajuda, mostrando-se sempre disponível e amiga.

À professora Dra. Helena T. Godoy, por aceitar participar da banca examinadora, podendo assim colaborar com seus conhecimentos.

À Gabriela, aluna de iniciação científica, que participou e vivenciou todas as dificuldades na realização da parte prática deste trabalho, colaborando com grande entusiasmo e profissionalismo para o sucesso dos resultados.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida e à FUNCAMP, por ter financiado a compra dos azeites de oliva, meu objeto de estudo.

A Marinalda, por sua imensa ajuda, mostrando-se sempre disponível e amiga.

Ao Waldomiro, pela grande colaboração em etapas essenciais deste trabalho.

A Camila, Alaíde e Cláudia que sempre estiveram prontas a ajudar.

A D. Namiko e Sr. Yshida, por me acolherem como filha.

A Márcia, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntas.

Aos colegas de laboratório, Juliana, Bei, Cibele, Maria, Miluska, Ana Paula, Carla, Cláudia e Márcia, pelo companheirismo, amizade e ajuda técnica.

Às estagiárias Fabiana e Giovana, por toda ajuda nos trabalhos práticos.

Aos meus colegas farmacêuticos e verdadeiros amigos, Diogo, Fabiana, Cíntia e Francisca, pelas palavras de incentivo e apoio que tanto precisei.

A todos que de alguma forma torceram e oraram por mim, desejando-me sucesso e realização profissional.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

CAPÍTULO 1.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1 Origem e difusão da Oliveira.....	6
1.1 Características gerais e climatológicas da oliveira.....	7
1.1.2 Variedades.....	9
1.2 Azeite de oliva e sua composição.....	9
1.3 Azeite de oliva e os fitosteróis.....	15
2 Produção do azeite de oliva	20
3 Consumo de azeite de oliva.....	21
4 Exportação do azeite de oliva.....	24
5 Produção de azeite de oliva no Brasil.....	25
6 Azeite de oliva e saúde.....	26
7 Classificação do azeite de oliva.....	30
7.1 Classificação do azeite de oliva no Brasil.....	32
7.1.1 Quanto ao processo.....	32
7.1.2 Quanto a acidez do Azeite virgem de oliva.....	32
7.2 Critérios de qualidade e pureza para azeite de oliva.....	33
8 Matéria insaponificável do azeite de oliva.....	35
9 Azeite de oliva e a legislação.....	38
10 Azeite de oliva e Adulteração.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

CAPÍTULO 2

Características de Qualidade de Azeites de Oliva Importados Disponíveis no Comércio de Campinas.....	61
RESUMO.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1 Azeites de oliva.....	66
2.2 Métodos.....	68
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPÍTULO 3

Quantificação de Fitosteróis em Azeite de Oliva por Cromatografia em Fase Gasosa.....	83
RESUMO.....	84
1 INTRODUÇÃO.....	85
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 Material.....	89
Azeites de Oliva.....	89
Reagentes.....	91
Equipamentos.....	92
Condições cromatográficas.....	92
2.2 Métodos.....	93
2.2.1 Obtenção da Matéria Insaponificável.....	93
2.2.2 Separação da fração esterólica da matéria insaponificável.....	94
2.2.3 Extração dos esteróis.....	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
3.1 Matéria insaponificável e fração de esteróis em azeite de oliva.....	96

3.2 Separação dos componentes esterólicos.....	97
3.3 Quantificação dos fitosteróis.....	100
3.4 Aplicação da metodologia em amostras de azeite de oliva disponíveis no mercado.....	102
4 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 115
ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Composição típica do azeite de oliva.....	14
Tabela 2. Produção mundial de azeite de oliva.....	21
Tabela 3. Produção de azeite de oliva na Comunidade Européia.....	21
Tabela 4. Consumo de azeite de oliva no mundo.....	23
Tabela 5. Consumo de azeite de oliva na Comunidade Européia.....	23
Tabela 6. Relação dos maiores importadores de azeite de oliva no mundo.....	24
Tabela 7. Relação dos maiores exportadores de azeite de oliva no mundo.....	25
Tabela 8. Exportação de azeite de oliva pela Comunidade Européia.....	25
Tabela 9. Classificação dos azeites de oliva de acordo com o Regulamento da Comunidade Econômica Européia /3568 / 91.....	31
Tabela 10. Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva e de óleo de bagaço de oliva.....	34
Tabela 11. Principais constituintes dos óleos e gorduras comestíveis.....	36
Tabela 12. Composição em ácidos graxos do azeite de oliva.....	39
Tabela 13. Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva segundo sua classificação.....	40

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE AZEITES DE OLIVA IMPORTADOS DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO DE CAMPINAS

Tabela1. Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Extra Virgem....	67
Tabela 2. Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva.....	67

Tabela 3. Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Puro.....	68
Tabela 4. Acidez (%AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.....	70
Tabela 5. Acidez (%AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.....	71
Tabela 6. Acidez (%AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.....	71
Tabela 7. Composição em ácidos graxos das 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.....	74
Tabela 8. Composição em ácidos graxos das 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.....	75
Tabela 9. Composição em ácidos graxos das 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.....	75
Tabela 10. Índice de iodo, índice de saponificação percentual de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.....	76
Tabela 11. Índice de iodo, índice de saponificação percentual de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.....	77
Tabela 12. Índice de iodo, índice de saponificação percentual de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.....	77

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM AZEITE DE OLIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Tabela 1. Dados retirados dos rótulos de Azeite de Oliva Extra Virgem.....	90
Tabela 2. Dados retirados dos rótulos de Azeite de Oliva.....	90
Tabela 3. Dados retirados dos rótulos de Azeite de Oliva Puro.....	90
Tabela 4. Percentual de fitosteróis em azeites de oliva extra virgem disponíveis no comércio de Campinas.....	104
Tabela 5. Percentual de fitosteróis em azeites de oliva disponíveis no comércio de Campinas.....	104
Tabela 6. Percentual de fitosteróis em azeites de oliva puro disponíveis no comércio de Campinas.....	104
Tabela 7. Teor de esteróis totais em azeites de oliva extra virgem disponíveis no comércio de Campinas.....	106
Tabela 8. Teor de esteróis totais em azeites de oliva disponíveis no comércio de Campinas.....	107
Tabela 9. Teor de esteróis totais em azeites de oliva puro disponíveis no comércio de Campinas.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Cromatograma da composição em esteróis, eritrodiol e uvaol de azeite de oliva, segundo Amelio, Rizzo e Varazini (1992)..... 18

Figura 2. Cromatograma da fração insaponificável total de azeite de oliva... 38

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM AZEITE DE OLIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Figura 1. Cromatoplaça da matéria insaponificável de azeite de oliva revelada com solução de sulfato de cobre saturada, para efeito de ilustração das bandas dos componentes insaponificáveis, principalmente os fitosteróis, separados em placa sem tratamento com KOH..... 97

Figura 2. Cromatograma de mistura de padrões de esterol e padrão interno (PI) sem derivatização, obtido por cromatografia em fase gasosa com coluna LM-5..... 98

Figura 3. Cromatograma de uma mistura de padrões de tocoferol, determinados nas mesmas condições aplicadas à determinação dos fitosteróis em azeite de oliva..... 99

Figura 4. Cromatograma da fração esterólica de um azeite de oliva contendo tocoferóis (ND) como contaminantes da banda isolada durante a extração dos fitosteróis da matéria insaponificável..... 100

Figura 5- Curva de padronização interna utilizada para quantificação de beta-sitosterol em azeite de oliva..... 101

Figura 6- Cromatograma da composição em fitosteróis de azeite de oliva adicionado de padrão interno..... 105

RESUMO

Nos últimos anos tem sido crescente a detecção de fraudes em azeite de oliva, sendo que o controle analítico é quase inexistente no Brasil. Com o intuito de disponibilizar ao setor de vigilância e controle de qualidade mais um instrumento na detecção de adulterações no azeite de oliva, realizou-se neste trabalho a adequação da metodologia para determinação da composição em fitosteróis no azeite de oliva, mediante saponificação da amostra na presença de padrão interno (dihidrocolesterol), extração e separação dos componentes insaponificáveis por cromatografia em camada delgada, isolamento e extração dos esteróis totais e identificação e quantificação de seus constituintes por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. A separação cromatográfica dos fitosteróis foi realizada em coluna capilar de sílica fundida LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3µm), com isoterma a 300°C. Foram adquiridas 29 marcas de azeite de oliva (azeite de oliva extra virgem, azeite de oliva e azeite de oliva puro) disponíveis no comércio de Campinas, importadas da Argentina, Espanha, Itália e Portugal, sendo que 27 marcas foram envasadas no país de origem. As amostras foram submetidas previamente à determinação da acidez (% AGL), medida do coeficiente de extinção específica (K_{232} e $K_{270 \text{ nm}}$), determinação da composição em ácidos graxos, teor de mono e poliinsaturados, teor de isômeros trans e dos índices de iodo e de saponificação calculados. Observou-se que o grau de acidez encontrava-se dentro dos limites estabelecidos para a classificação de cada tipo de azeite, mas 8 marcas apresentaram absorção específica no ultravioleta a 232 e 270 nm acima dos valores limites para a categoria do azeite. Pela composição em ácidos graxos e conseqüente avaliação dos índices de iodo e de saponificação, 4 marcas de azeite foram descartadas, em função do baixo teor de ácido oléico e elevado conteúdo de ácidos linoléico, linolênico e isômeros trans. Diante das irregularidades observadas, confirmou-se para estas 4 marcas a adulteração grosseira com outro óleo vegetal. As 25 marcas restantes foram submetidas à

avaliação da composição em fitosteróis, de modo a testar a eficiência da metodologia e avaliar a legitimidade dos azeites. As determinações foram realizadas em duplicata. O resultado do percentual dos principais fitosteróis mostrou que é possível detectar fraude no azeite de oliva com outros óleos vegetais, por apresentar teor de beta-sitosterol inferior ao valor mínimo de 93%, recomendado pela Resolução nº 482 da ANVISA. A quantificação dos fitosteróis totais complementou as informações anteriores e permitiu detectar adulteração do azeite de oliva com azeite de oliva de qualidade inferior.

SUMMARY

The detection of frauds in olive oil has been on the increase in the recent years, being the control almost inexistent in Brazil. With the intention to make it available another olive oil detection tool adulterations to the inspection and quality control sector it was accomplished in this work the methodology adequacy to determinate the phytosterols composition in olive oil, through saponification of the sample with internal standard (α -cholestanol), extraction of unsaponifiable matter and separation of the unsaponifiable components through thin layer chromatography, total sterols isolation and extraction and identification and quantification of its contents through gas chromatography with flame ionization detector. The phytosterols chromatographic separation was accomplished in melted silica capillary column LM-5 (5% phenyl 95% methyl polysiloxane, 30m x 0.25 mm x 0.3 μ m), with isotherm at 300°C. Twenty nine brands of olive oil were purchased (extra virgin olive oil, olive oil and pure olive oil) available in Campinas market, imported from Argentina, Spain, Italy and Portugal, from which 27 brands were bottled in the origin country. The samples had previously undergone a free fatty acid determination (%FFA), specific extinction coefficient determination (K_{232} e $K_{270\text{ nm}}$) and fatty acid composition determination and consequent evaluation of mono and polyunsaturated, of trans isomers content and calculated iodine and saponification values. It was observed that acidity content was within the established limits for the classification of each type of oil, however 10 brands that showed an ultraviolet absorptivity at 232 e 270 nm above the limit values for the oil category. Through the fatty acid composition and consequent evaluation of saponification and iodine values, 4 brands of oil were discarded, due to the low oleic acid and high linoleic, linolenic and trans isomers contents. Before the observed irregularities, it was confirmed for these 4 brands a gross adulteration with another vegetable oil. The remaining 25 brands were submitted to the evaluation of phytosterols composition, in order to test the efficiency of the methodology and to evaluate the legitimacy of the oils. The determinations were

performed in duplicates. The percentual result of the main phytosterols showed that it is possible to detect a fraud in olive oil with other vegetable oils, for presenting a beta-sytosterol content inferior to the minimum value of 93%, recommended by the ANVISA Resolution nº 482. The quantity of total phytosterols complemented the previous information and allowed to detect olive oil aduterations with inferior quality olive oils.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos tempos o azeite de oliva tem ganho popularidade em todo o mundo devido seu delicado aroma e sabor agradável, bem como pelo seu valor nutricional e importância para a saúde do consumidor. O azeite de oliva virgem de alta qualidade é obtido de olivas saudáveis e em perfeitas condições de maturação, sem qualquer manipulação ou tratamento que altere as propriedades químicas de seus componentes. Desta forma, o azeite de oliva virgem é um produto natural comparado com a maioria dos outros óleos vegetais que são obtidos de sementes oleaginosas por trituração e ainda necessitam da ajuda de solventes para serem extraídos (DOBARGANES, 2000; RANALLI, et al., 2000).

O azeite de oliva é um óleo nobre e apresenta elevado preço de mercado por suas características sensoriais, aliado ao processo lento de cultivo da oliveira e conseqüente produção limitada do mesmo. A maior parte da produção mundial do azeite de oliva origina-se dos países do Mediterrâneo, especialmente da Itália, Espanha, Grécia e França. Quantidades menores são produzidas na Tunísia, Turquia, Portugal, Marrocos, Líbia e outros países próximos ao Mar Mediterrâneo e também na Argentina e no Estado da Califórnia nos Estados Unidos. Entretanto, nem todo o azeite de oliva consumido no mundo é de boa qualidade. Grandes quantidades deste óleo são submetidas ao processo de refino, principalmente por se originarem de olivas de baixa qualidade.

A qualidade do azeite de oliva é influenciada por vários fatores, tais como: variedade da oliveira, condições climáticas e do solo, práticas de cultivo, estado de maturação das olivas, infestação por pragas, tempo de processamento das olivas após a colheita, entre outros. A principal classificação do azeite quanto à qualidade é feita com relação à acidez e às características organolépticas, estando diretamente relacionadas ao tipo de processamento sofrido pelo azeite (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1984; PEIXOTO, 1973).

No Brasil, a qualidade do azeite de oliva é regulamentada pela Resolução nº 482 da ANVISA, republicada em 2000, a qual classifica o azeite de oliva quanto ao processo de obtenção em azeite de oliva virgem, azeite de oliva refinado, azeite de oliva e óleo de bagaço e/ou caroço de oliva refinado. A categoria azeite virgem ainda recebe uma subclassificação de acordo com a acidez do azeite em: extra virgem, fino, semi-fino ou corrente e lampante. Para cada categoria de azeite existem parâmetros estabelecidos pela legislação que oferecem limites para se garantir a identidade e legitimidade do azeite de oliva consumido no país.

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por triacilgliceróis (95 – 98%) e uma complexa mistura de compostos minoritários (2 – 5%) de natureza química bastante variada. Estes constituintes exibem uma composição qualitativa e quantitativa que depende da espécie vegetal da qual eles são obtidos. O azeite de oliva é composto por 55 a 85% de ácido oléico, carotenóides, compostos fenólicos e fitosteróis (98 – 185 mg/100 g). Inclui ainda outros componentes minoritários tais como flavonóides, rutina, luteonina e esqualeno (STARK; MADAR, 2002).

O azeite de oliva tem sido alvo de diversos tipos de adulterações com outros óleos vegetais de baixo valor comercial, com azeite de oliva refinado, ou com óleo obtido da extração com solventes da torta residual da prensagem das olivas. Com o intuito de detectar e quantificar tais adulterações, muitos métodos têm sido desenvolvidos e aplicados às análises que determinam qualidade e pureza aos azeites de oliva comercializados mundialmente.

A determinação da composição em ácidos graxos é uma das principais análises utilizadas na detecção de adulterantes no azeite e segundo Trujillo-Quijano e Costa (1995), a cromatografia em fase gasosa de alta resolução é a técnica mais apropriada para esta avaliação.

No entanto, outros critérios são levados em consideração quando se pretende avaliar a pureza de um azeite de oliva, tais como: acidez, estabilidade oxidativa, teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados, presença de compostos oriundos do tratamento térmico a altas temperaturas e sua composição em fitosteróis.

O azeite de oliva apresenta composição em fitosteróis bastante particular e tem sido utilizada para detectar adulteração com outros óleos. Como todas as metodologias, sempre se requer técnicas complementares para o julgamento da genuinidade de um azeite. Dependendo do processamento pode-se remover grande parte dos esteróis, e estes óleos ao serem misturados ao azeite passam despercebidos na análise da fração esterólica. A determinação dos subprodutos de degradação da matéria insaponificável e glicerídica são ferramentas muito úteis para detecção de óleos tratados para conter baixo teor de esteróis.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo testar a metodologia para determinação e quantificação de fitosteróis em azeite de oliva, considerando a eficiência das etapas de preparação da amostra, a capacidade da coluna em separar com boa resolução os componentes esterólicos e o uso de padrão interno como compensador das perdas do analito que podem ocorrer durante as várias etapas que compõem a metodologia.

Algumas amostras de azeite de oliva comercializados em Campinas, importados da Argentina, Espanha, Itália e Portugal, foram submetidas às técnicas analíticas convencionais para caracterização da identidade e pureza dos azeites, tais como o percentual de ácidos graxos livres, o coeficiente de extinção específica em ultravioleta, os índices de iodo e de saponificação e a composição em ácidos graxos, segundo normas estabelecidas pela legislação em vigor no Brasil.

Após esta etapa preliminar de caracterização, a aplicação da metodologia para determinação da composição em fitosteróis foi avaliada nestas amostras, com o intuito de complementar o levantamento do perfil de qualidade dos azeites de oliva disponíveis ao consumidor e de disponibilizar a metodologia para que os laboratórios de vigilância e os importadores de azeite tenham acesso a mais um instrumento de investigação e monitoramento da qualidade dos azeites adquiridos.

CAPÍTULO 1.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Origem e difusão da Oliveira

A oliveira tem sido cultivada por milhares de anos nos países do Mediterrâneo e o azeite de oliva tem apresentado um papel importante na dieta dos habitantes desta região e também na sua economia e cultura (DOBARGANES, 2000).

O cultivo da oliveira é certamente anterior ao século XVI a.C., tendo se difundido pelas ilhas gregas através dos fenícios, que provavelmente a trouxeram da Ásia Menor e então a introduziram na Grécia, Líbia e Cártago. Os fenícios e cartaginenses são tidos como implantadores da oliveira na Espanha, tendo esta cultura se expandido para Portugal, Antilhas e América do Sul. As condições climáticas dos países do Mediterrâneo foram bastante favoráveis ao cultivo da oliveira, tendo se espalhado rapidamente através de todos os países da bacia do Mediterrâneo onde hoje é uma característica da região. O cultivo da oliveira atingiu regiões do continente americano onde as condições climáticas são semelhantes a do Mediterrâneo. Na América do Norte a olivicultura foi levada por missionários espanhóis e implantada inicialmente na Califórnia. Na América do Sul esta cultura se espalhou pela Argentina, Chile, Uruguai, Peru, Brasil e outros países, introduzida por imigrantes do Mediterrâneo (AUED-PIMENTEL, 1991).

A oliveira tem sido cultivada para a obtenção de azeitonas e azeite de oliva desde os tempos antigos. Na época do Império Romano o cultivo de olivas era praticado em todas as partes do Mediterrâneo. Hoje, com 98% das oliveiras do mundo, a região em torno do Mediterrâneo ocupa a maior parte da área de produção de azeite de oliva no mundo. Amplas flutuações na produção são características do cultivo de oliva. Elas estão relacionadas às incertezas do clima e à frutificação alternada, uma característica das oliveiras, na qual uma colheita

abundante tende a ser seguida por uma produção menor no ano seguinte. Nas últimas décadas a produção de azeite de oliva tem se caracterizado por período de grande desenvolvimento seguido por estagnação. Na década de 1980 a produção mundial esteve em torno de 1,8 milhões de toneladas, 40% acima do registrado em meados da década de 1960. Após um período relativamente estável de produção ocorreu uma melhora na segunda metade da década de 1990, atingindo 2,5 milhões de toneladas. A média para a produção mundial nos últimos três anos é de aproximadamente 2,7 milhões de toneladas (IOOC, 2003).

1.1 Características gerais e climatológicas da oliveira

A oliveira é uma oleácea perene, extremamente rústica, de longevidade excepcional. A espécie doméstica pode alcançar mais de 20 metros de altura, possui folhas estreitas e pequenas e flores brancas. O fruto, a azeitona, é uma drupa típica, arredondada, de 15 a 30 milímetros de altura e 15 a 20 milímetros de diâmetro, muito carnosa em certas variedades. No verão apresenta coloração verde e no outono vermelho-clara ou quase preta (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1987; PEIXOTO, 1973).

A azeitona é constituída do pericarpo e do caroço. O pericarpo é composto pelo epicarpo ou casca, pelo mesocarpo ou polpa e pelo endocarpo, que contém o caroço. A polpa representa de 66 a 85% do peso do fruto, o endocarpo de 13 a 30% e a casca de 1,5 a 3,5%. O caroço não excede 3% do peso do fruto. Cerca de 96 a 98% do total de óleo da azeitona encontra-se no pericarpo e o restante, isto é, 2 a 4% encontra-se no caroço (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1987).

Quando a azeitona atinge a completa maturação está saturada de óleo. A maturação da oliva exerce grande influência na qualidade do óleo obtido, sendo tal influência maior que a exercida por outros fatores com origem e variedade (FIORINO; PETRUCCIOLI, 1977).

Os processos bioquímicos de acúmulo de óleo na azeitona e os precursores de sua biossíntese durante o período de maturação dos frutos tem recebido considerável atenção nos últimos tempos. Tem-se estudado o conteúdo de açúcares durante o desenvolvimento e maturação dos frutos em diferentes cultivos e sabe-se que glicose, frutose e manitol são os açúcares predominantes nas olivas. No período de maturação o teor de óleo aumenta e o de açúcares diminui (NERGIZ; ENGEZ, 2000).

Alguns trabalhos relatam como a composição do óleo pode ser influenciada pela latitude. Também verificaram que a quantidade de ácido linoléico aumenta quando a temperatura diminui, contrário ao que acontece com o ácido oléico. Além disso, percebeu-se que o conteúdo de esteróis apresenta grandes flutuações. A concentração de beta-sitosterol, campesterol e estigmasterol decresce quando o clima se torna mais frio. A composição química do azeite de oliva também sofre variação sob influência da altitude. Olivas cultivadas próximas ao mar Mediterrâneo produzem óleos diferentes do que aquelas cultivadas nos Alpes (APARICIO; FERREIRO; ALONSO, 1994).

Mesmo sendo de clima temperado quente, a oliveira é uma planta que necessita de baixas temperaturas no período que antecede a floração para que se obtenha bons resultados na produção. São ideais as temperaturas de inverno com médias entre 8 a 10 graus Celsius, altitudes que variam entre 200 e 1.300 metros e regime de chuvas superior a 800 mm para produções econômicas. O pH do solo, que deve ser superior a 5,5, também interfere na qualidade da produção, principalmente do azeite. A oliveira é uma planta rústica e bem resistente a pragas e doenças. As principais doenças que atacam a planta são a tuberculose da oliveira (*Pseudomonas savastanoi Smith*), a antracnose da oliveira (*Gloeosporium olivarum*) e fumagina (*Cappodium elaeophilum*). As pragas Cochonilhas (*Saissetia*

oleae, Peru) e mosca da oliveira (*Dacus oleae*, Rossi), além de diversas espécies de formigas, também podem trazer prejuízos à plantação (MACHADO, 2003).

1.1.2 Variedades

A oliveira faz parte da família das Oleáceas, espécie *Olea europaea*. Apesar de outras espécies de oliveiras serem conhecidas a maioria das cultivadas na Europa e América pertencem a esta espécie. É muito difícil categorizar uma variedade depois de cultivada há séculos nas condições diversas de numerosos países. Nos países ao redor do Mediterrâneo existem mais de 50 variedades conhecidas por diferentes nomes, de acordo com o país e a região (AUED-PIMENTEL, 1991).

Distingue-se na espécie *Olea europaea* diversas variedades cujas diferenças podem ser causadas pelo solo e região de cultivo, pelo clima, entre outros fatores, aumentando o teor de óleo, o volume do fruto, o tamanho do caroço e o teor e consistência da polpa. Dependendo da finalidade a que se destina a produção das olivas é indispensável conhecer as características da variedade, isto é, tamanho e cor do fruto, no caso da conserva. Quando o objetivo é a extração do azeite, é importante o conhecimento da coloração do azeite, da aceitabilidade no mercado, das dificuldades de extração e do rendimento (PEIXOTO, 1973).

1.2 O azeite de oliva e sua composição

As olivas e o azeite de oliva são produtos importantes na cultura e dieta mediterrânea, junto com grãos, legumes, frutas, vegetais e vinho. Parte do valor nutricional desta dieta é atribuída ao azeite de oliva devido seu alto teor de ácidos graxos monoinsaturados e a seus constituintes menores tais como fitosteróis e compostos fenólicos. Há uma notável diferença na composição dos fenólicos

presentes na oliva e no azeite. Os polifenóis das olivas e do azeite de oliva são agentes antioxidantes efetivos devido sua capacidade de capturar radicais livres e de quelar metais (KECELI; GORDON, 2001).

O fruto da oliva é constituído de 50% de água, 1,6% de proteínas, 22% de óleo, 19,1% de carboidratos, 5,6 % de celulose e 1,5% de minerais (TURATTI; GOMES; ATHIÉ, 2002).

A qualidade do azeite de oliva é afetada por vários fatores, tais como técnicas agronômicas, estação do ano, estado sanitário das olivas, estágio de maturação, sistema de colheita e transporte, método e duração da estocagem e tecnologias de processamento. A preservação da qualidade depende das condições adotadas para estocar o produto e da duração da estocagem. Os azeites de qualidade elevada são obtidos de olivas frescas, sadias e colhidas no ponto ótimo de maturação. Entretanto, o meio ambiente e a variedade do cultivo são os fatores que basicamente mais afetam a tipicidade do produto (RANALLI, et al., 2000).

O processamento é o fator principal que afeta a qualidade do azeite de oliva. Os azeites obtidos por condições de prensagem apropriada originam produtos de excelente qualidade. Em estudos recentes observou-se 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 (RANALLI, et al., 2001).

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por triglicerídeos (95 – 98%) e uma complexa mistura de compostos minoritários (2 – 5%) de natureza química bastante variada. Estes constituintes menores exibem uma composição qualitativa e quantitativa que depende da espécie vegetal da qual eles são obtidos.

No entanto, em uma mesma espécie o conteúdo e a composição destes componentes pode variar devido às condições agronômicas e climáticas, à qualidade do fruto ou da semente, ao sistema de extração do óleo e aos processos de refino. Também durante a estocagem do óleo, reações de hidrólise, esterificação e oxidação podem originar mudanças nos compostos minoritários do produto (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

O azeite de oliva é composto por 55 a 85% de ácido oléico (cis 18: 1n-9), tocoferóis (5-25 mg/100 g, sendo 95% alfa-tocoferol), carotenóides (1 – 2 mg/100 g), compostos fenólicos tais como oleuropeína (20 – 500 mg/100 g) e fitosteróis (98 – 185 mg/100 g). Inclui ainda outros componentes minoritários tais como flavonóides, rutina, luteonina e esqualeno (STARK; MADAR, 2002).

Segundo Codex Alimentarius (Codex, 1979 e 1987) a composição em ácidos graxos, tanto do azeite virgem quanto do azeite de oliva refinado, [percentual (mol/mol) dos ésteres metílicos] é a seguinte: ácido oléico (55, 0 – 83,0), ácido palmítico (7,5 – 20,0), ácido linoléico (3,5 – 21,0), ácido esteárico (0,5 – 5,0), ácido palmitoléico (0,3 – 3,5), ácido linolênico (0,0 – 1,5), ácido mirístico (0,0 – 0,05) e outros ácidos graxos em quantidades diminutas (GUNSTONE; HARWOOD; PADLEY, 1994).

Os azeites de oliva da Espanha, Itália e Grécia geralmente têm um conteúdo baixo em ácido linoléico e palmítico e alto em ácido oléico, enquanto o azeite de oliva da Tunísia possui alto teor de linoléico e palmítico e teores mais baixos de ácido oléico (HAUMANN, 1996).

Atualmente, de acordo com o Regulamento da Comunidade Econômica Européia (CEE/ 3568 / 91) e a Resolução nº 482 da ANVISA, o limite máximo estabelecido para o ácido linolênico em azeites de oliva é de 0,9 em percentual

dos ésteres metílicos. Para os outros ácidos graxos os teores correspondem aos estabelecidos no Codex Alimentarius (ANVISA, 2000; CERT, 1995).

O azeite de oliva virgem obtido pela primeira prensagem a frio também contém uma faixa de compostos antioxidantes e constituintes do aroma. Alguns estudos têm sugerido que os antioxidantes do azeite de oliva virgem protegem contra o câncer e aterosclerose. Estas substâncias também contribuem para a estabilidade oxidativa do azeite. Os níveis de antioxidantes dependem de vários fatores tais como variedade da oliva, condições de cultivo e métodos de extração (GIMENO, et al., 2002).

A polpa das azeitonas contém compostos fenólicos, na sua maioria hidrossolúveis. No entanto, o azeite contém ainda algumas pequenas quantidades de fenóis. A classe dos fenóis inclui uma série de substâncias diferentes, de que fazem parte os compostos fenólicos simples, como o ácido vanílico, o ácido gálico, o ácido cumárico e o ácido caféico, o tirosol ou hidroxitirosol. Em média, estes fenóis simples representam 4,2mg/100g no azeite extra virgem e 0,47mg/100g no azeite refinado. Além disso, o azeite contém a oleuropeína e o ligstrosido (2,8mg/100g no azeite extra virgem e 0,93mg/100g no azeite refinado, respectivamente), ou moléculas mais complexas, como lignanos (4,15mg/100g no azeite extra virgem e 0,73mg/100g no azeite refinado, respectivamente), além de flavonóides, como por exemplo a apigenina ou a luteolina. O teor de compostos fenólicos em azeite depende da forma de cultura e da maturidade dos frutos quando da colheita. Por exemplo, a concentração de hidroxitirosol, tirosol e luteolina é tanto maior quanto maior for o grau de maturidade das azeitonas, enquanto que o teor total em compostos fenólicos e α -tocoferol diminui com o grau de maturidade (ASSMANN; WAHRBURG, 2003).

A intensidade do amargor do azeite de oliva tem sido atribuída à presença dos compostos fenólicos. Estes compostos são parcialmente solúveis em lipídeos e são transportados para o óleo durante sua extração (GARCÍA, et al., 2001).

A fração fenólica é muito complexa e os compostos fenólicos identificados e quantificados em azeites de oliva virgens podem ser divididos em três grupos: fenóis simples, ácidos fenólicos e derivados da oleuropeína. Há diferenças notáveis na composição de fenólicos no fruto das oliveiras e no azeite (KECELL; GORDON, 2001).

A fração insaponificável do azeite de oliva virgem representa de 1 a 2% do óleo. Alguns componentes desta fração, tais como esteróis, álcoois terpênicos e tocoferóis, têm sido extensamente estudados devido a sua importância na caracterização dos azeites e também na avaliação da qualidade destes óleos. A fração de hidrocarbonetos do azeite de oliva é composta em torno de 80 a 90% de esqualeno, um hidrocarboneto triterpenóide. Algumas pesquisas afirmam que a composição da fração hidrocarbônica de azeites de oliva virgens pode ser útil na sua caracterização (BORTOLOMEAZZI, et al., 2001).

O azeite contém alfa-tocoferol, o tocoferol com a mais elevada atividade da vitamina E, em quantidades que variam entre 1,2 e 43 mg/100g. Outros tocoferóis (β e γ) estão presentes apenas em pequenas quantidades. Os componentes secundários do azeite não têm apenas um efeito benéfico sobre a saúde, como também desempenham um papel importante para a estocagem e estabilidade do azeite. Diversos pesquisadores afirmam que independentemente da quantidade de compostos fenólicos contidos no azeite extra virgem estes compostos estão altamente relacionados com a sua estabilidade (ASSMANN; WAHRBURG, 2003).

A Tabela 1 mostra a composição lipídica típica dos azeites de oliva. Os componentes em maior concentração são os triglicerídeos (>90%), seguido dos

diglicerídeos e ácidos graxos livres. Os componentes minoritários representam menos de 2% do óleo, porém são os que contribuem com as características mais apreciadas no azeite, tais como: o sabor, o aroma, a cor, a estabilidade etc. A determinação de componentes minoritários, como os esteróis, tocoferóis e álcoois triterpênicos, são ferramentas importantes para determinar a pureza de um azeite (TRUJILLO – QUIJANO; COSTA, 1995).

Tabela 1- Composição típica do azeite de oliva

COMPONENTES PRINCIPAIS	
▪ Triglicerídeos	>90% (OOO, POO)
▪ Diglicerídeos	0,5 – 7 %
▪ Monoglicerídeos	< 0,05%
▪ Ácidos graxos livres	0,2 – 3,3%
COMPONENTES MINORITÁRIOS	
▪ Fosfolipídeos	40 –135 mg. kg ⁻¹ (Fosfatidilcolina)
▪ Esteróis	1000 – 2000 mg. kg ⁻¹ (Beta-sitosterol)
▪ Tocoferóis	100 – 700 mg. kg ⁻¹ (Alfa-tocoferol)
▪ Ceras	<350 mg. kg ⁻¹
▪ Pigmentos	
▪ Carotenóides	30 mg. kg ⁻¹
▪ Clorofilas	1 – 10 mg. kg ⁻¹
▪ Feofitinas	0,2 – 24 mg. kg ⁻¹
▪ Dihidroxitriterpenos	< 4,5% da fração insaponificável (eritrodiol e uvaol)
▪ Ésteres de ácidos graxos	C27 – C32 álcoois, esteróis esterificados
▪ Hidrocarbonetos	(Esqualeno)
▪ 4- metilesteróis	<1% da fração insaponificável (citrostadienol, gramisterol)
▪ Polifenóis	100 – 200 mg. kg ⁻¹
▪ Aromas	25 mg. kg ⁻¹ (2- trans- nonenol, pentanol, nonanol, metil butanol-1)

*Nomes entre parênteses indicam o (os) componente (s) de maior concentração de cada grupo.

Fonte: Trujillo–Quijano; Costa, 1995.

1.3 Azeite de oliva e os fitosteróis

O esteróis constituem uma família de compostos com função alcoólica encontrados em todas as gorduras em quantidades variadas (esteróis totais) e em diferentes proporções entre seus componentes. As gorduras animais possuem exclusivamente o colesterol, já as vegetais apresentam uma maior variabilidade, com um componente majoritário que é o beta-sitosterol, acompanhado de proporções variadas de outros esteróis segundo a espécie vegetal de procedência (CERT, 1995).

Os esteróis são substâncias derivadas de isopentenóides policíclicos hidroxilados tendo na sua estrutura o 1,2-ciclopentanofenantreno. Estes compostos contêm um total de 27 a 30 átomos de carbono e suas estruturas variam dependendo da extensão de modificações no sistema de anéis e na variação do tamanho da cadeia. Assim, o número e posição de duplas ligações em todos os policíclicos e o tamanho da cadeia dos esteróis pode ser diferente (ABIDI, 2001).

Os fitosteróis são encontrados na natureza principalmente na forma não hydrogenada. Entretanto, alguns derivados hydrogenados, por exemplo o beta-sitostanol do beta-sitosterol e o campestanol do campesterol, estão presentes em níveis muito baixos em relação aos seus precursores não hydrogenados. Nos vegetais, os esteróis estão na forma livre, esterificados a ácidos graxos ou como esteril glicosídeos. Quando na forma livre, estes são insolúveis na água e ligeiramente solúveis no óleo (~2%). A solubilidade dos fitosteróis aumenta quando estes estão esterificados a ácidos graxos. A esterificação dos fitosteróis não altera sua eficiência na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo, uma vez que estes serão prontamente hidrolisados no intestino em esteróis livres (forma ativa) e ácidos graxos, por ação da enzima colesterol esterase (NTANIOS, 2001).

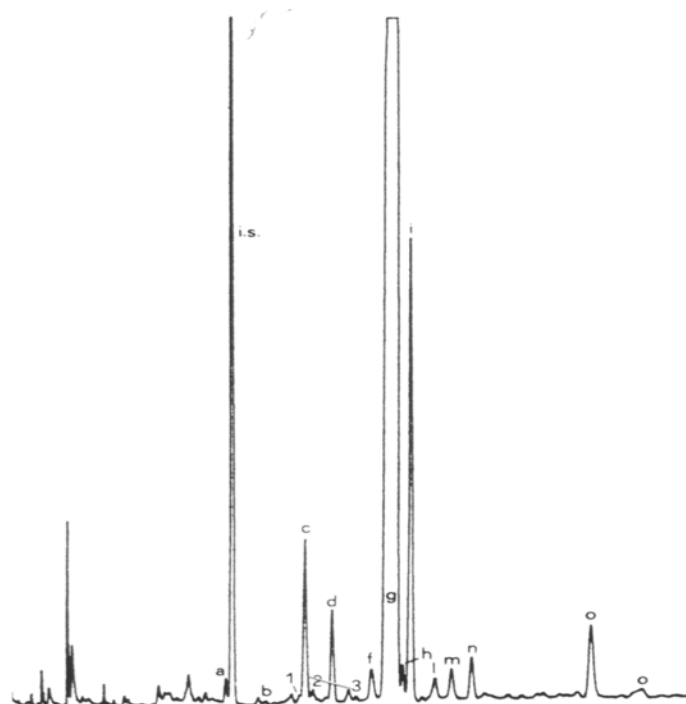
A análise da composição em esteróis dos lipídeos de sementes e frutos oleaginosos é de grande valia na caracterização da espécie vegetal de origem, sendo utilizada para avaliar as propriedades nutricionais de certos alimentos e para distinguir os diferentes óleos que podem estar presentes em misturas. Estes componentes comportam-se como excelente impressão digital das várias substâncias gordurosas (AUED-PIMENTEL, 1991; ALONSO, et al., 1997; CERT, MOREDA; GARCÍA-MORENO, 1997; MARIANI; VENTURINI, et al., 1997; TOIVO, et al., 1998).

A análise da fração insaponificável normalmente é muito útil na detecção de adulterações do azeite de oliva com outros óleos vegetais. O procedimento tradicional para a determinação da composição em esteróis envolve saponificação do azeite, extração da matéria insaponificável com éter etílico, lavagem do extrato com água, fracionamento da matéria insaponificável em cromatografia de camada delgada (CCD), isolamento e extração da fração de esteróis, derivatização, identificação e quantificação dos componentes da fração esterólica por cromatografia em fase gasosa (LOGNAY, et al., 1992).

As etapas do método tradicional de determinação de esteróis em óleos e gorduras foram avaliadas por Lognay e outros (1992), onde se observou que (1) a betulina é um bom padrão interno porque co-elui com os esteróis na placa de sílica gel e não interfere com nenhum outro componente na separação por cromatografia em fase gasosa; (2) o colestano, um outro padrão interno, não elui com a fração de esteróis e portanto, este padrão não compensa nenhuma perda dos esteróis durante a saponificação, a extração da matéria insaponificável e a re-extração dos esteróis da sílica gel; (3) o colestano não é derivatizado. Já em 2003, Cercaci, Rodriguez-Estrada e Lercker utilizaram com sucesso o dihidrocolesterol (alfa- colestanol) como padrão interno.

O uso de colunas cromatográficas com alta eficiência e seletividade é recomendado para se obter uma melhor separação dos esteróis, por exemplo, fases estacionárias de polaridade média, tal como poli- ciano propil fenil (metil) siloxano (OV-1701, CP-SIL19, CB, DB-1701 etc). O beta-sitosterol e o delta-5-avenasterol não têm boa resolução em algumas colunas apolares, são melhor separados em OV-1701 ou fase equivalente. Nestas condições, picos adicionais aparecem como cauda nos picos de campesterol e beta-sitosterol (LOGNAY, et al., 1992).

Amélio, Rizzo e Varazini (1992) determinaram esteróis em azeite de oliva utilizando colestanol como padrão interno e coluna capilar, SPB-5 (5% difenil- 94% dimetil-1% vinil polisiloxano, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μ m). O perfil cromatográfico pode ser visualizado na Figura 1.



Identificação dos picos: is= padrão interno (t_R = 8,8 min), a= colesterol, b= brassicasterol, c= campesterol, d= estigmasterol, e= delta 5,23-estigmastadienol, f= clerosterol, g= beta-sitosterol, h= sitostanol, i= delta 5-avenasterol, l= delta 5,24- estigmastadienol, m= delta 7-estigmastenol, n= delta 7-avenasterol, o= eritrodiol + uvaol. 1= 24-metilenocolesterol (t_R = 10,6 min), 2= campestanol (t_R = 11,0 min), 3= delta 7-campesterol (t_R = 12,2 min).

Figura 1- Cromatograma da composição em esteróis, eritrodiol e uvaol de azeite de oliva, segundo Amelio, Rizzo e Varazini (1992).

Cert, Moreda e García-Moreno (1997) compararam o método convencional para determinação de esteróis e álcoois triterpênicos com uma metodologia alternativa que utiliza a purificação da matéria insaponificável por CLAE. No cromatograma obtido pela CLAE observa-se que a fração esterólica se divide em três picos diferentes, correspondentes aos delta 5-esteróis, alfa-colestano (padrão interno) e delta 7-esteróis. Esta fração se encontra perfeitamente separada da fração dos álcoois triterpênicos. A determinação por cromatografia em fase gasosa dos derivados silanizados origina um cromatograma praticamente livre de interferentes.

Peixoto, Santana e Abrantes (1998), avaliaram a composição em fitosteróis de 10 amostras de azeite de oliva, sendo 5 envasadas no país de origem e 5 envasadas no Brasil. De acordo com os resultados obtidos, os azeites envasados no Brasil se encontravam adulterados com outro óleo, pois os teores para campesterol e estigmasterol estavam acima do recomendado pelo Codex Alimentarius (1993) e o beta-sitosterol estava muito aquém do limite mínimo de 93%. Os azeites envasados no país de origem encontravam-se dentro dos limites recomendados pela legislação regulamentadora da época.

Tem sido relatado que o refino de óleos diminui o conteúdo de esteróis totais de óleos brutos e aumenta a proporção de esteróis esterificados (PHILLIPS, et al., 2002). A determinação de esteróis totais livres e esterificados em azeite de oliva foi realizada por Pasqualone e Catalano (2000), comparando o efeito da neutralização no conteúdo destes esteróis. Foi observado que os azeites neutralizados, segundo procedimentos industriais, apresentaram perda de 50% em esteróis totais e de 60% em esteróis livres. Baseado nestes resultados a determinação destes esteróis e suas proporções representaria um instrumento a mais para avaliar a qualidade dos azeites de oliva extra virgem e o seu perfil de legitimidade, sendo apropriada para detectar a adição de óleo refinado em azeite extra virgem.

Cercaci, Rodriguez-Estrada e Lercker (2003) desenvolveram um método cromatográfico para detectar adulteração de azeite de oliva com óleo de avelã. O método inclui extração por fase sólida em cartuchos de sílica, saponificação a frio da fração coletada, purificação por CCD em placa com sílica e injeção da banda de esteróis extraída da CCD em um cromatógrafo em fase gasosa com coluna capilar de sílica fundida (SPB- 5, 5% difenil- 95% dimetil polisiloxano, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme), em condição isotérmica onde as temperaturas do forno, injetor e detector foram de 270, 290, e 310°C,

respectivamente. Para a identificação e quantificação dos esteróis foi utilizado colestanol como padrão interno.

2 Produção do azeite de oliva

Segundo Machado (2003), atualmente a área plantada mundialmente com oliveiras é de 8,3 milhões de hectares. A produção mundial encontra-se em torno de 15,8 milhões de toneladas, sendo a Espanha o maior produtor, com 43% do total produzido, seguida da Itália e Grécia, com 18% e 14%, respectivamente. A produção mundial de azeite de oliva atingiu, em 2002, um volume de 2,4 milhões de toneladas, algo em torno de 2,7 trilhões de litros de azeite. A Espanha já era o maior produtor de azeite de oliva, respondendo por 39% da produção mundial. Itália e Grécia vinham em seguida, com 19% e 17%, respectivamente, do total produzido no mundo. A azeitona e o azeite movimentam, anualmente, cerca de US\$ 2,5 bilhões, sendo que o azeite representa 98% deste valor. Espanha, Itália e Grécia são os maiores exportadores de azeite de oliva e, juntos, respondem por quase 80% das exportações do produto.

Considerando os dados das Tabelas 2 e 3, percebe-se que a Comunidade Européia é dominante no setor de produção de azeite de oliva. Até 1981 ocupava o terceiro lugar na produção mundial de azeite, com uma quantia de 425.000 toneladas. Em 1981, após a inclusão da Grécia na Comunidade, esta passou para cerca da metade do total do mundo como um todo. Em 1986, depois da união entre Espanha e Portugal, a Comunidade se tornou referência no mercado, atingindo 80% da produção mundial. Na década de 1990 a produção de azeite de oliva pela Comunidade Européia foi de mais de 51% (IOOC, 2003).

Tabela 2- Produção mundial de azeite de oliva* (1000 TON)

	Comunidade Européia	Turquia	Síria	Tunísia	Marrocos	Outros	TOTAL
1995/96	1.518	46	84	65	40	97	1.849
1996/97	1.899	203	125	291	85	107	2.710
1997/98	2.294	41	70	95	74	56	2.630
1998/99	1.838	171	115	222	69	130	2.545
1999/00	1.873	54	81	220	44	120	2.392
2000/01	2.090	176	165	135	38	121	2.725
2001/02	2.650	66	92	37	64	110	3.019
2002/03	2.004	142	165	73	43	125	2.552

* Inclui azeite de bagaço de oliva. Fonte: IOOC, 2003.

Tabela 3- Produção de azeite de oliva na Comunidade Européia (1000 TON)

	Espanha	Itália	Grécia	Portugal	França	TOTAL
1996/97	947,3	370,0	390,0	44,8	2,5	1754,6
1997/98	1007,0	620,0	375,0	42,0	2,7	2116,7
1998/99	791,9	403,5	473,0	35,1	3,4	1706,9
1999/00	669,1	734,0	420,0	50,2	4,1	1878,4
MÉDIA	871,3	532,1	414,5	43,0	3,2	1864,2
2000/01	973,7	509,0	430,0	24,6	3,2	1940,5
2001/02	1411,4	656,7	358,3	33,7	3,6	2463,7
2002/03	865,0	590,0	375,0	29,0	4,7	1863,7
MÉDIA	1083,4	585,2	387,8	29,1	3,8	2089,3

Fonte: IOOC, 2003.

3 Consumo de azeite de oliva

Embora o azeite de oliva ocupe somente 3% da quantia de óleos vegetais comestíveis disponíveis no mercado mundial, ele é tradicionalmente o óleo mais utilizado na sua área de produção. Desde 1990, entretanto, uma quantia significativa de azeite de oliva tem sido consumido em áreas não produtoras (IOOC, 2003).

Tem-se estimado que a Grécia, a Itália e a Espanha utilizam em média 71%, 42% e 37%, respectivamente, em azeite de oliva do seu total de gordura vegetal disponível (LIPWORTH, et al., 1997).

O consumo de azeite de oliva tem sido uniforme, e não apresenta as flutuações características da produção. Desde 1995/96 a média anual de consumo é de 6%, com um desenvolvimento maior em outros novos mercados (IOOC, 2003).

Separadamente da Comunidade Européia, a qual é a maior consumidora do mundo (Tabelas 4 e 5), os maiores consumidores da bacia do Mediterrâneo são a Síria (100.000 toneladas), Turquia (70.000 toneladas), Marrocos (50.000 toneladas) e Tunísia (40.000 toneladas) (IOOC, 2003).

Com um consumo de mais de 220.000 toneladas (totalmente importado), os Estados Unidos tornaram-se o segundo maior mercado consumidor de azeite de oliva. Há também um consumo apreciável na Austrália, Japão, Canadá e Brasil, com consumo anual em torno de 25.000 a 35.000 toneladas (IOOC, 2003).

O percentual de venda do azeite de oliva extra virgem em relação às vendas de azeite de oliva é maior de ano para ano, ocupando 37% no Brasil e Austrália, 50% no Japão, 54% nos Estados Unidos e 61% no Canadá (IOOC, 2003).

Tabela 4- Consumo de azeite de oliva no mundo* (1000 TON)

	Comunidade Européia	Estados Unidos	Japão	Austrália	Canadá	Outros	TOTAL
1995/96	1.402	105	17	17	14	374	1.928
1996/97	1.687	144	26	22	19	473	2.371
1997/98	1.841	152	34	18	18	485	2.548
1998/99	1.824	159	29	24	19	501	2.556
1999/00	1.844	174	28	24	20	480	2.570
2000/01	1.918	212	30	31	25	497	2.713
2001/02	1.994	221	32	28	24	461	2.760
2002/03	2.028	225	33	29	26	490	2.831

* Inclui azeite de bagaço de oliva. Fonte: IOOC, 2003.

A Comunidade Européia é líder no consumo mundial de azeite de oliva, apresentando média de 1,8 milhões de toneladas nos últimos três anos. A quantia média consumida por ano é de 71,5% do consumo mundial. Itália, Espanha e Grécia consomem mais de 85% do total consumido pela Comunidade (IOOC, 2003).

Tabela 5- Consumo de azeite de oliva na Comunidade Européia (1000 TON)

	Espanha	Itália	Grécia	Portugal	França	Outros	TOTAL
1996/97	470,2	675,0	240,0	62,0	58,8	60,7	1566,7
1997/98	550,4	698,0	240,0	69,3	75,6	71,9	1705,2
1998/99	528,5	705,0	245,0	66,1	78,8	85,5	1708,9
1999/00	502,6	714,0	265,0	66,5	81,5	98,4	1728,0
MÉDIA	512,9	698,0	247,5	66,0	73,7	79,1	1677,2
2000/01	577,8	729,0	270,0	60,5	92,0	102,8	1832,1
2001/02	631,2	735,0	270,0	61,5	94,5	101,6	1893,8
2002/03	620,0	750,0	270,0	61,0	95,0	110,1	1906,1
MÉDIA	609,7	738,0	270,0	61,0	93,8	104,8	1877,3

Fonte: IOOC, 2003.

Tabela 6- Relação dos maiores importadores de azeite de oliva no mundo

MAIORES IMPORTADORES	2000/01	2001/02	2002/03
Comunidade Européia	127,0	42,5	33,5
Austrália	30,0	26,5	27,0
Brasil	25,0	22,5	23,0
USA	200,0	193,0	205,0
Canadá	25,5	24,0	25,5
Japão	29,0	31,5	33,0

Fonte: COI- Importação (1,0 tonelada) Julho 2003.

Nos três últimos anos, os países membros da Comunidade Européia (CE) que ocupam os primeiros lugares nos setores de produção e exportação de azeite de oliva são Espanha, Grécia e Itália. Os maiores importadores são França e Alemanha, e os que mais consomem são Espanha, Itália e França. Os Estados Unidos ocupam posição de destaque no mercado de importação de azeite (Tabela 6) (COI, 2003).

4 Exportação do azeite de oliva

Em 1990 a Comunidade Européia contava com mais da metade (54,5%) da exportação mundial de azeite de oliva, ficando ainda a Turquia e Tunísia com 32% e 7,7%, respectivamente. A primeira metade da década vivenciou um período de relativa estabilidade com a Comunidade exportando perto de 170.000 toneladas. De 1996/97 em diante, seguiu-se um período de distinto desenvolvimento das exportações, com média de 320.000 toneladas nos últimos três anos de acompanhamento do mercado (Tabelas 7 e 8). Itália e Espanha representam 90% do total das exportações da Comunidade (IOOC, 2003).

Tabela 7- Relação dos maiores exportadores de azeite de oliva no mundo

MAIORES EXPORTADORES	2000/01	2001/02	2002/03
Argentina	4,0	5,0	5,0
Comunidade Européia	291,0	324,5	348,0
Síria	10,0	5,5	20,0
Tunísia	95,0	22,0	30,0
Turquia	92,0	28,0	70,0
USA	3,5	5,0	5,0

Fonte: COI- Exportação (1,0 tonelada) Julho 2003.

Tabela 8- Exportação de azeite de oliva pela Comunidade Européia (1000 TON)

	Espanha	Itália	Grécia	Portugal	França	Outros	TOTAL
1996/97	66,7	129,5	5,2	17,0	1,1	0,7	220,2
1997/98	76,2	123,5	8,0	17,4	1,1	1,0	227,2
1998/99	63,6	125,3	5,4	12,4	1,0	0,9	208,6
1999/00	87,7	182,7	8,2	17,5	1,4	1,0	298,5
MÉDIA	73,6	140,3	6,7	16,1	1,2	0,9	238,6
2000/01	88,3	173,0	10,0	17,3	1,3	1,1	291,0
2001/02	112,5	182,9	10,0	16,2	1,0	1,7	324,3
2002/03	115,0	200,0	15,0	16,0	1,1	0,8	347,9
MÉDIA	105,3	185,3	11,7	16,5	1,1	1,2	321,1

Fonte: IOOC, 2003.

Os Estados Unidos, Austrália, Japão, Canadá e Brasil contam praticamente com todo o azeite exportado pela Comunidade Européia. Em 2000/01 os outros maiores exportadores para países não produtores de oliva foram a Turquia (1.140 toneladas para o Canadá, 13.800 toneladas para os Estados Unidos, 540 toneladas para a Austrália e 330 para o Japão), Tunísia (6.100 toneladas para os Estados Unidos) e Argentina (2.900 toneladas para o Brasil) (IOOC, 2003).

5 Produção de azeite de oliva no Brasil

Tanto a azeitona quanto o azeite de oliva são presença constante na mesa dos brasileiros. Por isso o Brasil é o 7º maior país importador de azeitona e azeite

de oliva do mundo. Segundo estudo realizado pela EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), em 2002, o Brasil importou cerca de US\$ 96 milhões, sendo US\$ 38 milhões em azeitonas e US\$ 58 milhões em azeite de oliva. Considerando o volume total importado pelo país no ano passado, o mercado brasileiro de azeitona e azeite de oliva movimenta, anualmente, cerca de R\$ 930 milhões entre importação, beneficiamento e distribuição (MACHADO, 2003).

O maior plantio de oliveira no país está na fazenda Santa Maria, em Delfim Moreira, na Serra da Mantiqueira, sul de Minas Gerais. O projeto começou em 1984 e ao longo de dez anos foram plantadas 80 mil mudas de oliveira. O sul de Minas foi escolhido para o plantio das oliveiras por ser uma região de clima frio, bem semelhante ao clima do sul do Brasil e Europa. A oliveira é uma planta típica de clima frio e necessita de temperaturas baixas, entre 8 e 10 °C, para resultados satisfatórios na produção (MACHADO, 2003).

6 Azeite de oliva e saúde

O azeite de oliva não é apreciado apenas por seus méritos gastronômicos. Desde os tempos antigos ele tem sido reconhecido pelas suas propriedades nutritivas e curativas. Tal afirmação tem vindo de constatações de inúmeras pesquisas epidemiológicas, clínicas e experiências colaborativas conduzidas em escala internacional e que têm demonstrado que o azeite de oliva é eficaz na proteção da saúde humana (VIOLA, 1995).

A diminuição da taxa de mortalidade e o aumento da expectativa de vida dos povos da região do Mediterrâneo tem sido comparada com os povos de países mais desenvolvidos do norte da Europa. A dieta é considerada a grande responsável pelas diferentes estatísticas de mortalidade. O azeite de oliva é a

principal fonte de gorduras na dieta Mediterrânea e não é apenas um nutriente, mas desempenha um papel positivo na saúde do consumidor. Além disso, muitas pesquisas buscam elucidar a relação entre estrutura bioquímica e função dos compostos presentes naturalmente no azeite de oliva, avaliando o seus efeitos no corpo humano (STARK; MADAR, 2002).

A fração insaponificável dos óleos vegetais é considerada minoritária com relação à fração glicerídica, no entanto pode exercer grande influência nas propriedades biológicas de cada óleo. Deste modo, a terapia imunossupressora em numerosas enfermidades inflamatórias está relacionada não exclusivamente aos ácidos graxos poliinsaturados da dieta gordurosa, mas a outros componentes, provavelmente aos minoritários ou insaponificáveis (PUERTA; MAESTRO-DURÁN; RUIZ-GUTIÉRREZ, 1997; STARK; MADAR, 2002).

O azeite de oliva extra virgem apresenta boa estabilidade oxidativa devido à prevalência de ácidos graxos monoinsaturados sobre os poliinsaturados, e à presença de antioxidantes naturais, em particular tocoferóis e polifenóis. A ingestão de azeite de oliva é considerada responsável pelo baixo colesterol sérico e pelo baixo risco de doenças cardíacas em países do Mediterrâneo. A baixa incidência de doenças coronarianas pode estar relacionada ao perfil de ácidos graxos do azeite de oliva, à presença de componentes minoritários com atividade biológica, ou a ambos os fatores (CIAPPELLANO, et al., 1994; STARK; MADAR, 2002; MORENO; MITJAVILA, 2003).

É cada vez maior o número de evidências que indicam que o azeite de oliva, através dos efeitos benéficos que exerce sobre o metabolismo de lipídeos, a pressão arterial, a diabetes e os mecanismos de formação de coágulos, desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças cardíacas. A aterosclerose e as doenças coronarianas são causadas por uma combinação de diferentes fatores, muitos dos quais podem ser corrigidos. Os fatores dietéticos,

nomeadamente a ingestão de gorduras alimentares, estão diretamente relacionados ao desenvolvimento destas enfermidades. Na sua maioria, as dietas da Europa Ocidental e da Europa do Norte são ricas em ácidos graxos saturados, o que está fortemente relacionado aos altos índices de incidência de morbidade e mortalidade por doenças cardíacas registradas nestas áreas. Por contraste, nos países Mediterrâneos, onde as populações consomem a sua dieta tradicional e a maioria das calorias de gordura são obtidas a partir do azeite de oliva, existe uma baixa incidência das doenças coronarianas (ASSMANN; WAHRBURG, 2003).

Numerosos estudos têm mostrado que os compostos fenólicos do azeite de oliva são potentes inibidores da oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) in vitro. A oxidação in vivo do LDL está ligada à formação de placas de ateroma, os quais posteriormente irão contribuir para o desenvolvimento de doenças coronarianas. Em particular, o hidroxitirosol, um dos principais constituintes fenólicos do azeite de oliva, é responsável pela redução do risco de doenças coronarianas e aterosclerose, e também inibe a agregação plaquetária (TUCK; HAYBALL, 2002).

O azeite de oliva tem apresentado efeitos benéficos na pressão sangüínea. Fez-se um estudo na população, comparando os efeitos do azeite de oliva e do óleo de girassol alto oléico, por um período de quatro semanas em mulheres hipertensas. Os óleos continham concentração semelhante de ácidos graxos monoinsaturados e foram utilizados em alimentos cozidos e saladas. Depois das quatro semanas de consumo, houve diminuição da pressão sangüínea nas mulheres tratadas com azeite de oliva e nenhuma alteração significativa foi observada nas mulheres tratadas com óleo de girassol alto em oléico. Isto sugere que há outros componentes no azeite de oliva que são responsáveis pela proteção vascular (STARK; MADAR, 2002).

Alguns experimentos foram realizados para avaliar a participação do esqualeno (hidrocarboneto predominante na fração insaponificável do azeite de oliva) na saúde de consumidores de azeite de oliva. O esqualeno é um metabólito utilizado na síntese de colesterol. Assim, teoricamente uma dieta rica em esqualeno pode vir a transformá-lo em colesterol e aumentar o nível de colesterol plasmático. No entanto, este aumento na síntese de colesterol não está associado com um aumento consistente nos níveis séricos, possivelmente como resultado de um aumento concomitante da eliminação fecal. Além disso, estudos sugerem um efeito protetor do esqualeno contra o câncer. Na Grécia, mulheres que consomem azeite de oliva como principal fonte gordurosa, têm uma taxa de câncer de mama de 1/3, se relacionado à incidência do mesmo em mulheres americanas (ASSMANN; WAHRBURG, 2003).

Em estudos controle, o consumo de azeite de oliva tem se mostrado eficiente na redução do risco de câncer de mama na Espanha e na Grécia. Os antioxidantes fenólicos encontrados no azeite também podem contribuir para as propriedades anticâncer do azeite de oliva. Estes compostos são conhecidos como inibidores das espécies de oxigênio reativo, os quais estão envolvidos na atividade do processo carcinogênico (STARK; MADAR, 2002).

Os fitosteróis, em especial o beta-sitosterol, reduzem a concentração plasmática de LDL-colesterol. Isto se deve à inibição da absorção intestinal e também a uma possível alteração do metabolismo do colesterol no fígado e intestino. A diminuição da concentração de colesterol sérico é mais evidente em pessoas hipercolesterolêmicas e em pessoas com dieta rica em colesterol. Há também vários relatos dos efeitos anticâncer dos fitosteróis. Estudo controle, no qual homens com câncer de próstata foram tratados com beta-sitosterol, o número de células diminuiu em 24% e houve indução de apoptose (morte celular programada) (ASSMANN; WAHRBURG, 2003).

Segundo Roche e colaboradores (2000), uma dieta rica em azeite de oliva reduz significativamente a concentração do colesterol plasmático e a concentração do LDL colesterol foi em média 15% menor seguida de uma dieta com ácidos graxos monoinsaturados, derivados de azeite de oliva, melhorando ainda o metabolismo lipídico pós-prandial e o risco de trombose.

Há evidências de que o azeite de oliva seja capaz de atuar na modificação da resposta imune de seres vivos. Experiências com animais em laboratório comprovam isso. Embora ainda haja poucas referências científicas neste assunto, o azeite de oliva tem se mostrado um agente imunomodulador. Investigações nesta área são feitas para elucidar os benefícios do azeite de oliva na resposta imune e avaliar seu potencial no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias (STARK; MADAR, 2002).

7 Classificação do azeite de oliva

A qualidade do azeite de oliva é influenciada por vários fatores, tais como: variedade da oliveira, condições climáticas e do solo, práticas de cultivo, estado de maturação das olivas, infestação por pragas, tempo de processamento das olivas após a colheita, entre outros. Por exemplo, olivas colhidas e logo processadas produzem óleo com aroma e sabor de melhor qualidade, com baixa acidez e coloração mais esverdeada do que o óleo obtido de olivas processadas após um longo período de armazenamento (KIRITSAKIS; MARKAKIS, 1984; PEIXOTO, 1973).

A principal classificação do azeite quanto à qualidade é feita com relação à acidez e às características organolépticas, estando diretamente relacionadas ao tipo de processamento sofrido pelo azeite (PEIXOTO, 1973).

A legislação da Comunidade Económica Europeia (CEE) classifica os azeites em seis classes (Tabela 9). No mercado, no entanto, é comum encontrar apenas os azeites extra virgens, azeite virgem e azeite de oliva puro (mistura de azeite virgem com azeite refinado). Os azeites lampantes não podem ser diretamente consumidos, mas são refinados e podem compor os azeites. As características químicas (acidez, peróxidos e absorvidade na região do ultravioleta) e organolépticas são os principais parâmetros de qualidade utilizados na classificação dos azeites (TRUJILLO-QUIJANO; COSTA, 1995).

Tabela 9- Classificação dos azeites de oliva de acordo com o Regulamento da Comunidade Económica Europeia / 3568 / 91.

CATEGORIA DO AZEITE	ACIDEZ (b) (%)	PERÓXIDOS (meq 02/ kg)	K232	K270	K270 (Alumina)	Delta K	EXAME ORGANO- LÉPTICO
Oliva extra virgem	M 1,0	M 20	M 2,50	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5
Oliva virgem	M 2,0	M 20	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5
Oliva virgem corrente	M 3,3	M 20	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5
Oliva virgem lampante	>3,3	> 20	M 3,70	> 0,25	M 0,11	-	< 3,5
Oliva refinado	M 0,5	M 5	M 3,40	M 1,20	-	M 0,16	-
Oliva (a)	M 1,5	M 15	M 3,30	M 1,00	-	M 0,13	-
Bagaço de oliva bruto	> 2,0	-	-	-	-	-	-
Bagaço de oliva refinado	M 0,5	M 5	M 5,50	M 2,50	-	M 0,25	-
Bagaço de oliva	M 1,5	M 15	M 5,30	M 2,00	-	M 0,20	-

(a) Mistura de azeites virgem e refinado

(b) Acidez expressa em % AGL (ácidos graxos livres) como ácido oléico

M- Máximo

K232 e K270 – Valor de absorvidade a 232 e a 270 nm, em isopropanol

K270 (alumina) – Valor de absorvidade após passagem do azeite em coluna de alumina.

Delta K = $K_m - \frac{K_{m-4} + k_{m+4}}{2}$

2

Km representa a extinção específica no comprimento de onda m, correspondente a uma valor máximo de absorvância na gama de 270 nm.

Fonte: CERT, 1995.

7.1 Classificação do azeite de oliva no Brasil

A classificação que segue se refere à Resolução nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, republicada em 20 de junho de 2000. Esta classificação é a que está em vigor dentro do território Nacional e é com base nos seus critérios que a comunidade científica se norteia.

7.1.1 Quanto ao processo

- A)** Azeite virgem de oliva: azeite obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, particularmente condições térmicas, que não levem à deterioração do azeite, e que não tenha sido submetido a outro tratamento que não a lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Excluem-se os óleos obtidos por meio de solvente ou re-esterificação e misturas com óleos de outra natureza.
- B)** Azeite de oliva refinado: azeite de oliva obtido pelo refino do Azeite virgem de oliva, com acidez final, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5 g/100g.
- C)** Azeite de oliva: azeite de oliva constituído pela mistura de Azeite de oliva refinado com Azeite virgem de oliva extra, fino ou comum. Não poderá ser misturado com o Azeite virgem de oliva lampante. O produto deverá ter acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,5 g/100g.
- D)** Óleo de bagaço e/ou caroço de oliva refinado: óleo refinado obtido do bagaço e/ou caroço de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5 (g/100g).

7.1.2 Quanto a acidez do Azeite virgem de oliva

- A)** Azeite virgem de oliva extra: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,0 g/100g.

- B)** Azeite virgem de oliva fino: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 2,0 g/100g.
- C)** Azeite virgem de oliva comum ou semi-fino ou corrente: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 3,3 g/100g. O azeite virgem comum não pode ser pré embalado quando destinado diretamente para a venda ao consumidor final. O produto pode ser misturado com Azeite Refinado de Oliva para constituir o tipo comercial designado somente como Azeite de Oliva.
- D)** Azeite virgem de oliva lampante: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, superior a 3,3 g/100g. O azeite virgem de oliva lampante não pode ser pré embalado quando destinado diretamente ao consumidor final. É, obrigatoriamente, destinado ao refino, não podendo ser usado para constituir mistura com azeite refinado. O produto pode ser destinado para usos que não sejam diretamente os do gênero alimentício, e não pode ser usado diretamente como ingrediente de gênero alimentício.

7.2 Critérios de qualidade e pureza para azeite de oliva

Segundo Cert (1995), o controle analítico das gorduras vegetais tem como finalidade determinar as características principais de qualidade, pureza e resíduos estranhos. A qualidade determina as categorias dos azeites e, portanto, está relacionada com os níveis de preços. A pureza garante a ausência de misturas do azeite com outros óleos, como consequência de uma contaminação acidental durante o processo de extração, envase, ou transporte, ou de uma prática fraudulenta derivada da diferença de preços entre os óleos. Os resíduos que geralmente se controlam são os restos de tratamentos agrícolas nas plantações (praguicidas e herbicidas), os produtos empregados na obtenção dos óleos (solventes, contaminantes da água), contaminantes ambientais e substâncias naturais de caráter tóxico presentes no vegetal de onde se extrai o óleo.

De acordo com três organizações internacionais (Conselho Oleícola Internacional- COI, União Européia- EU e Codex Alimentarius Commission), os parâmetros de qualidade e pureza para o azeite de oliva incluem: acidez, índice de peróxidos, absorção de luz ultravioleta (K₂₇₀, Δ K e K₂₃₂), análise sensorial, impurezas insolúveis, conteúdo de Ferro, conteúdo de Cobre, composição em ácidos graxos, isômeros trans, ácidos saturados na posição 2 do triacilglicerol, esteróis, eritrodiol e uvaol, ceras, trilinoleína e triglicerídeos ECN 42, estigmastadienos, esterenos (Tabela 10) (CERT, 1995).

Tabela 10- Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva

Produto	Ácidos graxos na posição 2 dos triglicerídios (%)	Estigmastadienos (mg/kg) ⁽¹⁾	Diferença NCE 42 ⁽²⁾	Trilinoleína (%)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₇₀ com alumina ⁽³⁾	Delta K
Azeite virgem extra	M 1,3	M 0,15	M 0,2	M 0,5	M 2,50	M 0,20	M 0,10	M 0,01
Azeite virgem	M 1,3	M 0,15	M 0,2	M 0,5	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Azeite virgem comum	M 1,3	M 0,15	M 0,3	M 0,5	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Azeite refinado	M 1,5	-	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	-	M 0,16
Azeite	M 1,5	-	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	-	M 0,13
Azeite virgem lampante	M 1,3	M 0,50	M 0,3	M 0,5	M 3,70	m 0,25	M 0,11	-
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	M 2,0	-	M 0,5	M 0,6	M 5,50	M 2,50	-	M 0,25

M= máximo; m= mínimo

(1) Soma dos isômeros que podem (ou não) ser separados em coluna capilar.

(2) Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCDE42 obtido por cálculo teórico.

(3) Para verificar a presença de óleos refinados, quando K₂₇₀ exceder o limite da categoria correspondente deve proceder a determinação de K₂₇₀ após passagem por coluna de alumina.

Fonte: ANVISA / Resolução nº 482/ 2000.

8 Matéria insaponificável do azeite de oliva

A fração insaponificável do azeite de oliva não excede mais que 2% do total do óleo e é constituída de compostos minoritários. Incluem nesta fração muitas substâncias com natureza e estrutura química bastante diferentes, o que leva a considerá-la como impressão digital para os óleos. Desta forma, a matéria insaponificável é de grande utilidade na autenticação ou caracterização das variedades de azeites de oliva virgem ou na identificação de suas origens geográficas (DOBARGANES, 2000; BORTOLOMEAZZI, et al., 2001).

Segundo Cert e colaboradores (2000), a determinação dos constituintes minoritários é essencial para a avaliação analítica de qualidade, origem, método de extração, processo de refino e possível adulteração dos óleos vegetais. Os principais grupos de compostos que compõem a fração insaponificável dos óleos vegetais são: álcoois graxos, ésteres de cera, hidrocarbonetos, tocoferóis, tocotrienóis, esteróis, compostos fenólicos, voláteis, pigmentos, compostos glicéricos minoritários e ácidos triterpênicos (Tabela 11).

Dobarganes (2000) reuniu em nove grupos os principais componentes da matéria insaponificável do azeite de oliva e colocou-os em ordem crescente de polaridade:

- 1- Hidrocarbonetos, sendo o esqualeno o principal deles; hidrocarbonetos de cadeia linear (parafinas) em proporção menor; hidrocarbonetos de estrutura triterpênica e alguns com estrutura esteroidal, formados pela desidratação de esteróis através do refino ou pela manipulação do azeite;
- 2- Tocoferóis, predominando o alfa-tocoferol;
- 3- Álcoois de estrutura triterpênica; álcoois saturados de cadeia linear com vinte, vinte e dois, vinte e quatro, vinte e seis e vinte e oito átomos de carbono;

- 4- 4,4- dimetil esteróis;
- 5- Esteróis, sendo o beta-sitosterol e o Δ^5 - avenasterol os principais deles;
- 6- Diálcoois terpênicos, tais como eritrodiol e uvaol, ambos compostos muito característicos do azeite de oliva, ácidos terpênicos e aldeídos;
- 7- Compostos fenólicos e flavonóides;
- 8- Pigmentos, clorofilas e carotenos;
- 9- Compostos voláteis, responsáveis pelo aroma de azeite de oliva virgem.

Tabela 11- Principais constituintes dos óleos e gorduras comestíveis

COMPOSTOS GLICERÍDICOS	COMPOSTOS NÃO- GLICERÍDICOS
Triglicerídeos	Hidrocarbonetos
Diglicerídeos	Ácidos graxos livres
Monoglicerídeos	Ceras
Fosfolipídeos	Ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos
	Esteróis e metil esteróis
	Álcoois e diálcoois triterpênicos
	Vitaminas e tocoferóis
	Pigmentos
	Ácidos terpênicos
	Outros constituintes e contaminantes (fenóis, metais etc)

Fonte: Ruiz-Gutiérrez; Pérez-Camino, 2000.

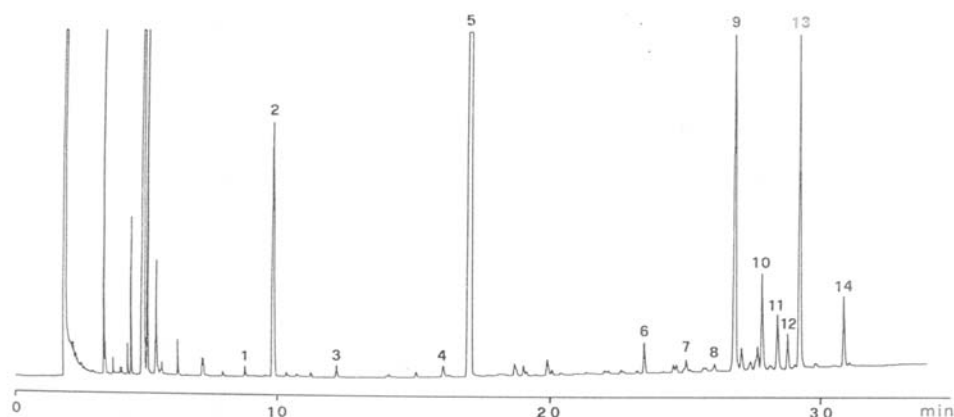
A aplicabilidade de um método analítico para caracterizar um óleo vegetal está baseada na identificação daqueles componentes que expressam uma ligação com sua origem e atributos de qualidade do óleo. Entretanto, isto é uma tarefa difícil porque a fração insaponificável contém várias classes de compostos com ampla faixa de polaridade, diferentes concentrações e estrutura química variada. Por isso, os métodos requerem geralmente o isolamento e a determinação dos micro constituintes por meio de vários processos de separação, identificação e quantificação. Uma concentração dos componentes de interesse normalmente é necessária, mas também uma alta eficiência na separação e seletividade. Estas

características geralmente são alcançadas por meio de técnicas cromatográficas (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

O isolamento dos compostos minoritários de óleos comestíveis (ésteres de cera, diglicerídeos, esteróis, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, ácidos triterpênicos, fosfolipídeos e compostos alterados ou oxidados) tem sido descrito em vários trabalhos utilizando sílica, NH_2 , NH_2^+ , C_{18} , bem como colunas com fase diol. A precisão requerida em qualquer isolamento por extração em fase sólida vai depender das técnicas analíticas utilizadas posteriormente na determinação quantitativa dos compostos que são de interesse. Extrações líquido-líquido ou líquido-sólido, bem como por cromatografia em camada delgada (CCD) são técnicas clássicas para diferentes classes de lipídeos encontrados em óleos e gorduras vegetais. Em extrações líquido-líquido, clorofórmio, éter dietílico ou acetato de etila são utilizados em proporções variadas para separar classes lipídicas. Esta metodologia é um processo demorado, uma vez que se extrai em múltiplas etapas e em alguns casos grandes volumes de solventes orgânicos podem ser necessários para se obter uma extração eficiente. Além disso, a formação de emulsões é muito comum, o que diminui a eficiência da extração de alguns compostos (RUIZ-GUTIÉRREZ; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Para analisar a fração insaponificável dos óleos vegetais é necessário uma etapa de isolamento preliminar da matriz de triglicerídeos. Para isto são utilizados três procedimentos básicos: saponificação, partição líquido-líquido e técnicas cromatográficas. A saponificação (aquecimento com solução alcoólica de hidróxido de potássio) transforma os compostos glicerídicos em sabões polares permitindo a extração da fração insaponificável com hexano e éter etílico. Contudo este procedimento não é apropriado para ésteres de cera, ésteres de esteroide, fenóis, pigmentos, compostos glicerídicos minoritários e fosfolipídeos, uma vez que eles são alterados durante a saponificação (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Frega e colaboradores (1992) avaliaram a composição da fração insaponificável do azeite obtido por prensagem de olivas de dois cultivos, Frantoio e Leccino, em diferentes graus de maturação e estudaram as frações por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar polar com alta estabilidade térmica. A metodologia envolveu a saponificação da amostra na presença de esqualeno como padrão interno, a extração da matéria insaponificável e tratamento com diazometano (CH_2N_2) para derivatizar os ácidos graxos livres eventualmente presentes. A fração insaponificável foi separada mediante cromatografia em camada delgada (CCD), tendo como fase móvel hexano e éter etílico (60/40, v/v). A placa foi revelada com solução etanólica 0,2% de 2,7-diclorofluoresceína. Os componentes da matéria insaponificável foram determinados por cromatografia em fase gasosa. A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido



1)docosanol; 2) P.I. (esqualeno); 3) tetracosanol; 4) esacosanol; 5) esqualeno; 6) α -tocoferol; 7) campesterol; 8) stigmasterol; 9) β -sitosterol; 10) Δ^5 -avenasterol; 11) cicloartenol; 12) não identificado; 13) 24-metilencicloartanol; 14) citrostadienol.

Figura 2- Cromatograma da fração insaponificável total de azeite de oliva

9 Azeite de oliva e a legislação

A Resolução nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, republicada em 20 de junho de 2000, que regulamenta o setor de óleos vegetais comestíveis

comercializados no país estabelece limites máximos e mínimos para alguns parâmetros físico-químicos e compostos presentes nos óleos, responsáveis pela sua identidade, qualidade e pureza. Tais limites devem ser seguidos e utilizados como parâmetros durante as avaliações químicas e físico-químicas dos óleos realizadas pelos laboratórios de vigilância, valendo também para a classificação dos diferentes tipos de azeite de oliva.

Os principais parâmetros considerados na legislação para azeite de oliva são os seguintes:

Tabela 12- Composição em ácidos graxos do azeite de oliva

Ácido graxo	Nomenclatura	g/100g
C 14:0	Mirístico	M 0,05
C 16:0	Palmítico	7,5 - 20,0
C 16:1	Palmitoléico	0,3 - 3,5
C 17:0	Margárico	< 0,3
C 17:1	Heptadecenóico	< 0,6
C 18:0	Estearico	0,5 - 5,0
C 18:1	Oléico	55,0 - 83,0
C 18:2	Linoléico	3,5 - 21,0
C 18:3	Linolênico	M 0,9
C 20:0	Araquídico	M 0,6
C 20:1	Gadoléico	M 0,4
C 22:0	Behênico	M 0,2
C 24:0	Lignocérico	M 0,2

M= máximo

Fonte: ANVISA / Resolução nº 482/ 2000

Tabela 13- Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva segundo sua classificação.

Produto	Soma dos isômeros trans oléicos (%)	Soma dos isômeros trans Linolêicos + trans Lino lênicos (%)	Colesterol (% no total de esteróis)	Brassicasterol (% no total de esteróis)	Campes terol (% no total de esteróis)	Estig masterol (% no total de esteróis)	Beta sitosterol (% no total de esteróis) ⁽¹⁾	Delta-7-estig masterol (% no total de esteróis)	Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (% no total de esteróis)
Azeite virgem extra	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite virgem comum	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite comum	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite refinado	M 0,20	M 0,30	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite	M 0,20	M 0,30	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite virgem lampante	M 0,10	M 0,10	M 0,5	M 0,1	M 4,0	-	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	M 0,40	M 0,35	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campes terol	m 93	M 0,5	m 1800	m 12

M= máximo; m= mínimo

(1) $\Delta 5,23$ - Estigmastadienol+ Clerosterol+ Sitosterol+ Sitostanol+ $\Delta 5$ -avenasterol+ $\Delta 5,24$ -Estigmastadienol

Fonte: ANVISA / Resolução nº 482/ 2000

10 Azeite de oliva e Adulteração

Nos últimos anos o azeite de oliva tem ganho enorme popularidade. Isto se atribui ao seu delicado balanço de aromas e a seu possível efeito benéfico à saúde humana. Devido a isso ele vem apresentando os mais altos preços no mercado de óleos vegetais comestíveis. O elevado valor comercial do azeite de oliva o faz suscetível a adulterações e portanto, metodologias cada vez mais sofisticadas e precisas são necessárias para uma correta avaliação de sua pureza. Os avanços recentes nas técnicas cromatográficas, tanto na separação da fração glicerídica com os da fração insaponificável, têm facilitado enormemente a detecção de adulterações (TRUJILLO-QUIJANO; COSTA, 1995).

A maioria dos trabalhos na área de adulteração de óleos comestíveis está baseada em técnicas cromatográficas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase gasosa de alta resolução têm sido aplicadas na quantificação de ácidos graxos, triglicerídeos, esteróis, tocoferóis e hidrocarbonetos. Entretanto, estas técnicas separativas têm sido complementadas ou substituídas por muitas outras técnicas modernas, tais como cromatografia por fluido supercrítico, cromatografia quiral, cromatografia com íons prata, determinações utilizando isótopo de carbono estável, espectrometria de massa, espectrometria por ressonância magnética nuclear, espectrofotometria no infravermelho próximo e espectroscopia de Raman- FT (APARICIO; APARICIO-RUIZ, 2000; PARCERISA, et al., 2000).

Em 1989, Lanzón, Cert e Albi desenvolveram um método analítico sensível para detectar pequenas quantidades de azeite de oliva refinado em azeite de oliva virgem. O método baseava-se na detecção de estigmasta-3,5- dieno, substância que se forma a partir da desidratação do beta-sitosterol como consequência do tratamento térmico favorecido pelas terras clarificantes durante o refino.

Em 1994, Cert e colaboradores propuseram um método para determinação de estigmasta-3,5-dieno para detectar azeite de oliva refinado em azeite de oliva virgem e descreveram o procedimento analítico incluindo saponificação do azeite, fracionamento da matéria insaponificável em coluna de sílica gel e determinação por cromatografia em fase gasosa. A proposta do trabalho foi investigar a formação do produto de desidratação do beta-sitosterol durante os diferentes processos de refino e confirmar a utilização do método na detecção de azeite de oliva virgem com óleos refinados.

Estigmasta-3,5-dieno e outros compostos originários da desidratação dos esteróis são produzidos durante o processo de refino, principalmente nas etapas de clarificação e desodorização. Logo, eles não devem estar presentes em azeite de oliva virgem. A presença deles em azeites declarados virgem, representa fraude por mistura com óleos refinados (AMÉLIO; RIZZO; VARAZINI, 1998; DOBARGANES; CERT; DIEFFENBACHER, 1999).

A Comissão Europeia regulamenta que o limite máximo de estigmastadienos em amostras de azeite de oliva virgem seja de 0,15 mg/kg e amostras de azeite de oliva submetidas ao refino está na faixa de 2 – 45 mg/kg. De acordo com a maioria dos pesquisadores, a clarificação é a principal etapa do refino que leva à formação de estigmastadienos. Pequenas quantidades são produzidas pelo aquecimento a temperaturas acima de 150 °C, mas ocorrem algumas perdas nas condições de desodorização. Entretanto, também foi relatado que a desodorização causa uma formação significativamente maior de estigmastadienos em óleos de milho, soja e canola, se comparada com outras etapas do refino, incluindo a clarificação (GORDON; FIRMAN, 2001).

Devido a fatores econômicos a adulteração intencional do azeite de oliva pela adição de óleo de soja espalhou-se por grande parte do mundo. Com a intenção de detectar e quantificar tal adulteração, muitos métodos foram

desenvolvidos e aplicados na rotina de análise dos laboratórios de vigilância. Embora estes métodos sejam bastante simples, estes não possuem um alto grau de precisão, uma vez que é difícil determinar qual óleo está presente na amostra. Com o advento de fases estacionárias resistentes a altas temperaturas, tornou-se possível injetar o óleo diretamente em uma cromatógrafo em fase gasosa, evitando assim as hidrólises e as etapas de derivatização. Devidos às determinações por cromatografia em fase gasosa a altas temperaturas produzir um perfil da composição triglicerídica de cada óleo vegetal, a adulteração pode ser detectada por comparação. Neste caso, a presença de óleo de soja é verificada pela presença do triglicerídeo trilinoleína (LLL) em amostras de azeite de oliva. O limite de detecção para este método foi de 4% de soja em azeite de oliva e usou-se uma curva de calibração para a quantificação da adulteração do azeite de oliva com óleo de soja (ANTONIOSI; CARRILHO; LANÇAS, 1993).

Em azeite de oliva, os ésteres de cera se localizam principalmente no epicarpo do fruto e durante o processo de extração a fração destes ésteres é transferida para o óleo. A extração do azeite de bagaço por solvente causa um aumento quantitativo dos ésteres de cera no azeite. Assim, a concentração de cera é muito maior nos óleos de bagaço que nos azeites obtidos por prensagem a frio. Para se detectar adulteração com óleos extraídos com solvente a determinação dos ésteres de cera é de grande importância (AMÉLIO; RIZZO; VARAZINI, 1993; AMÉLIO; RIZZO; VARAZINI, 1998).

As fraudes geralmente são feitas de modo que se tornem não detectáveis pelos métodos de controle convencionais, como por exemplo a determinação da composição em ácidos graxos. Como a faixa de ácido oléico é grande, a concentração do óleo adicionado é ajustada de tal forma que a concentração dos ácidos graxos no óleo resultante esteja dentro dos limites estabelecidos para azeite de oliva. Além disso, o óleo adulterado sofre uma desesterolização, ou seja, os esteróis do óleo adulterante são removidos pelo processo de clarificação

usando altas concentrações de terras clarificantes a altas temperaturas. Isto acontece quando se adiciona óleo de girassol alto oléico ao azeite de oliva (BIEDERMANN, et al., 1996). Esta fraude, vista da disponibilidade de óleo de girassol alto oléico nos países da Comunidade Européia e na Argentina, é fácil de ser executada e portanto deve ser monitorada pelos países importadores.

Segundo Mariani e Venturini (1997), a determinação da fração esterólica é utilizada para distinguir os diferentes óleos que podem estar presentes em misturas. Entretanto, esta mesma fração pode ser destruída por algumas tecnologias, dificultando o reconhecimento dos diferentes óleos. Um bom exemplo é o óleo de girassol alto oléico no azeite de oliva. Ambos possuem uma composição em ácidos graxos muito semelhante, enquanto a composição esterólica é consideravelmente diferente. Porém, com a desesterolização do óleo de girassol estas diferenças desaparecem, tornando este óleo não identificável no azeite de oliva.

A detecção, especialmente a determinação de baixos níveis de adulteração (abaixo de 10%) é um problema analítico. A maioria dos métodos para detecção de misturas em óleos são baseados na medida dos produtos da desesterolização em azeite de oliva (TARANDJIISKA; MAREKOV, 1998).

A determinação de alguns diálcoois triterpênicos, como eritrodiol e uvaol é recomendada na investigação da qualidade de azeite de oliva, pois estes compostos são comumente utilizados como indicadores do tipo de extração do óleo. Está estabelecido que a concentração de eritrodiol e uvaol em óleos prensados é claramente menor do que o seu correspondente em óleos extraídos por solvente. Por esta razão, a determinação de eritrodiol e uvaol é utilizada para distinguir azeite de oliva de diferentes qualidades tais como o azeite de oliva extra virgem (prensagem a frio) e os extraídos por solventes ou por prensagem do resíduo. O método para esta análise envolve várias etapas, como remoção dos

triglicerídeos por saponificação, fracionamento da matéria insaponificável em várias classes de compostos e sua subsequente determinação por cromatografia em fase gasosa. Este método convencional é trabalhoso, demorado e envolve perda de informações importantes durante a saponificação (BLANCH; VILLÉN; HERRAIZ, 1998; BLANCH, et al., 1998).

De acordo com Peixoto, Santana e Abrantes (1998), os principais tipos de adulteração em azeites de oliva incluem adição de outros óleos vegetais e/ ou animais, óleos vegetais parcialmente hidrogenados, óleos vegetais submetidos à remoção dos esteróis (desesterolizados) e óleos reesterificados. A complexidade que envolve a composição dos diferentes tipos de azeite de oliva, bem como as conseqüências dos processos de refino, hidrogenação e reesterificação tornam a detecção da adulteração, muitas vezes, um problema de difícil solução. O trabalho deste grupo foi estudar os vários índices (acidez, absorvidade a 232 e 270 nm, índice de iodo, composição em esteróis, composição em ácidos graxos, teores de ácido eláidico e de esqualeno) utilizados na avaliação de qualidade e identidade do azeite de oliva e aplicá-los a algumas marcas comercializadas no Brasil.

Antoniassi e colaboradores (1998) relatam que em azeite de oliva podem ocorrer dois tipos de adulteração: adição de outros óleos vegetais e mistura de azeite de oliva virgem e óleos de oliva refinado de qualidades distintas. O trabalho deste grupo foi avaliar o padrão de identidade e qualidade de 44 amostras de azeite de oliva e de óleos compostos de soja/oliva, através da determinação da composição em ácidos graxos e esteróis, do coeficiente de extinção específica no ultravioleta a 232 e 270 nm, dos índices de acidez e peróxidos, do teor da matéria insaponificável e do teor de esteróis totais.

A composição dos hidrocarbonetos dos óleos comestíveis tem sido estudada e os n-alcanos endógenos nas plantas sugerem ser resultado da descarboxilação de ácidos graxos de cadeia longa. Trabalhos anteriores a este

indicam que é possível, usando amostras de n-alcano e a soma dos n-alcenos individuais entre nC_{15} e nC_{33} , fazer a distinção entre óleos brutos e refinados de diferentes plantas. Deste modo, torna-se possível usar o perfil dos n-alcenos como um meio de determinar a autenticidade do azeite de oliva e qualquer adulteração deste óleo com outros óleos de menor valor (WEBSTER, et al., 2000).

A determinação de óleo de avelã em azeite de oliva é uma questão de interesse, por ele ser um adulterante difícil de ser detectado nas concentrações de interesse (5 – 20%). Isto se deve principalmente ao fato de que o conteúdo de alguns compostos em óleos adulterados pode estar em alguns casos dentro dos limites estabelecidos para azeite de oliva genuíno (BLANCH, et al., 2000). A composição em ácidos graxos da avelã é muito semelhante à do azeite de oliva, sendo o ácido oléico e ácido linoléico são os principais ácidos graxos em ambos os óleos. Além disso, fica difícil fazer a distinção com base na composição em ácidos graxos devido a certos fatores como clima e origem geográfica (PARCERISA, et al., 2000).

A detecção de óleo de avelã em azeite de oliva é um problema difícil devidos aos componentes comuns utilizados para identificar o óleo, por exemplo os triglicerídeos, ácidos graxos, esteróis ou tocoferóis, não serem apropriados em função da semelhança entre eles nos dois óleos ou da variabilidade destes componentes em diferentes cultivos. Uma abordagem promissora para detectar óleo de avelã em azeite é a determinação de ((E)-5-metilhepta-2-en-4-one) presente na fração polar do óleo de avelã. Portanto, tem-se estudado a fração polar do azeite de oliva, a qual inclui derivados ésteres e éteres de polifenóis, presentes em quantidades maiores que os fenóis e o-difenóis simples. A determinação por cromatografia líquida de alta eficiência da fração polar tem sido muito útil na identificação e quantificação dos componentes polares no azeite de oliva (GORDON; COVELL; KIRSCH, 2001).

A análise da fração insaponificável é muito útil para detectar adulterações do azeite de oliva com outros óleos vegetais. Entretanto, esta não é eficiente no caso de mistura com óleo de avelã. A quantia e composição dos esteróis totais, álcoois lineares e triterpênicos podem não evidenciar níveis do óleo de avelã abaixo de 30%. Contudo, a determinação separada da fração de esteróis livres e esterificados pode ser excelente para determinação de tal mistura, uma vez que ambas as frações têm diferente composição e podem oferecer informações mais precisas sobre a origem do azeite de oliva (CERCACI; RODRIGUEZ-ESTRADA; LERCKER, 2003).

Os métodos cromatográficos comumente utilizados para detectar adulteração em azeite de oliva virgem por outros óleos sofrem muitas desvantagens. Em geral, eles são pouco específicos, destroem a amostra, são demorados e qualitativos. Tem-se considerado que a espectroscopia por ressonância magnética nuclear com ^{13}C seja uma técnica viável para analisar os ácidos graxos mais abundantes dos vários óleos. Relatos na literatura apontam que esta técnica pode ser muito útil na detecção de adulteração de azeite de oliva virgem por outros óleos (MAVROMOUSTAKOS, et al. , 2000).

Os triacilgliceróis do azeite de oliva e os de vários óleos de sementes oleaginosas (milho, algodão, palma, amendoim, soja e girassol) são separados por cromatografia capilar em fase gasosa com coluna capilar de sílica fundida e detector de ionização em chama. A adulteração do azeite de oliva com um baixo teor (<5%) de qualquer destes óleos (exceto o óleo de amendoim) pode ser verificada pela detecção do aumento dos níveis de trilinoleína ou tripalmitina, triglicerídeos geralmente ausentes ou presentes em níveis muito baixos (<0,5%) neste óleo. Uma adulteração com mais de 20% de óleo de amendoim pode ser detectada pela elevação nos níveis de palmitodilinoleína. Os métodos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa oferecem uma nova abordagem à solução dos problemas baseados na observação de que

espécies de triglicerídeos altamente insaturados contendo ácido linoléico, ácido linolênico, ou ambos, estão quase ausentes em azeites de oliva, mas alguns deles são predominantes em óleos adulterantes (ANDRIKOPOULOS; GIANNAKIS; TZAMTZIS, 2001).

Segundo Bonvehí, Torrentó e Coll (2001), em óleos vegetais refinados há alguns hidrocarbonetos gerados pela desidratação de esteróis. A literatura indica que, assim como a presença de estigmastadienos em óleos refinados se deve às etapas de clarificação e desodorização, a presença de hidrocarbonetos esteroidais com três duplas ligações no sistema de anéis também. A determinação destes compostos proporciona um controle mais preciso e seguro e poderia substituir o método clássico que utiliza o ultravioleta na determinação dos dienos e trienos conjugados. Os compostos com duplas ligações conjugadas também são formados durante a estocagem. Por outro lado, os produtos da desidratação de esteróis não foram observados como resultado de estocagem.

Segundo Gamazo-Vázquez, García-Falcón e Simal-Gándara (2003), a contaminação accidental do azeite de oliva pode ocorrer durante o envase, etapa na qual a linha de processo de engarrafamento pode trazer resíduos de outros óleos vegetais engarrafados anteriormente. Os autores descrevem um procedimento químico e instrumental baseado na determinação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa com detecção em espectrofotometria de massa, para detecção e quantificação de outros óleos vegetais presentes no azeite de oliva, a fim de diagnosticar se a contaminação ocorreu na linha de envase.

Dourtoglou e colaboradores (2003) propuseram um novo método para determinar adulteração do azeite de oliva com mistura de outros óleos vegetais. O método baseia-se na determinação do percentual de cada ácido graxo mais o percentual dos mesmos ácidos graxos na posição 1 e 3 do triglicerídeo. Com este

novo método é possível distinguir misturas do azeite com outros óleos em níveis de até 5%. Também é possível prever, por aplicação de modelo experimental, a origem da semente dos óleos utilizados na adulteração.

A composição em tocoferóis dos óleos vegetais determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa e as proporções entre as diferentes classes de tocoferóis (γ/β e β/δ), têm sido um bom indicador da presença de óleo de avelã em azeite de oliva. Entretanto, é aconselhável aplicar outras análises para evitar afirmação falsa de adulteração, devido a ampla variabilidade da composição em tocoferóis dos óleos e da degradação dos mesmos durante o refino (CERCACI; RODRIGUEZ-ESTRADA; LERCKER, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 935, p. 173-201, 2001.

ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; JUÁREZ, M. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 131-135, 1997.

AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high- performance liquid chromatographic and high- resolution gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 606, p. 179- 185, 1992.

AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Separation of wax esteres from olive oils by high-performance liquid chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 70, n. 8, p. 793- 796, aug, 1993.

AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Separation of stigmasta-3,5-diene, squalene isomers, and wax esters from olive oils by single high-performance liquid chromatography run. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 4, p.527-530, 1998.

ANDRIKOPOULOS, N. K.; GIANNAKIS, I. G.; TZAMTZIS, V. Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. **Journal of Chromatographic Science**, Amsterdam, v.39, p. 137-145, april, 2001.

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D. A.; SZPIZ, R. R.; JABLONKA, F. H.; LAGO, R. C. A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 1, n. 1, 2, p. 32-43, jan/ dez, 1998.

ANTONIOSI FILHO, N. R.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F. M. Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high- temperature capillary gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 1051- 1053, oct, 1993.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, Brasília, nº 3029, republicada em 20/06/2000.

APARICIO, R.; APARICIO-RUIZ, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 93- 104, 2000.

APARICIO, R.; FERREIRO, L.; ALONSO, V. Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 292, p. 235- 241, 1994.

ASSMANN, G.; WAHRBURG, U. **Health effects of the minor components of olive oil**. Disponível em: <
http://europa.eu.int/comm/agriculture/prom/olive/medinfo/uk_ie/factsheets/fact10.htm>. Acesso em: 12/ 11/ 2003.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação do grau discriminatório de parâmetros analíticos do azeite de oliva: 1. Aplicação da espectrofotometria derivada.**

1991. 223 p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BIEDERMANN, M.; GROB, K.; MARIANI, C.; SCHMIDT, J.P. Detection of desterylized sunflower oil in olive oil through isomerized Δ^7 -sterol. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 202, n. 3, p.199-204, 1996.

BLANCH, G. P.; CAJA, M. M.; CASTILHO, M. L. R.; HERRAIZ, M. Comparison of different methods for the evaluation of the authenticity of olive oil and hazelnut oil. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 3153- 3157, 1998.

BLANCH, G. P.; CAJA, M. M.; LEÓN, M.; HERRAIZ, M. Determination of (E)-5-methylhept-2-en-4-one in deodorised hazelnut oil. Application to the detection of adulterated olive oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 140- 144, 2000.

BLANCH, G. P.; VILLÉN, J.; HERRAIZ, M. Rapid analysis of free erythrodiol and uvaol in olive oils by coupled reversed phase liquid chromatography – gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 1027- 1030, 1998.

BONVEHÍ, J.S.; TORRENTÓ, M.S.; COLL, V. A laboratory study of the bleaching process in stigmasta-3,5-diene concentration in olive oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 78, n. 3, p. 305-309, 2001.

BORTOLOMEAZZI, R.; BERNO, P.; PIZZALE, L.; CONTE, L. S. Sesquiterpene, alkene, and alkane hydrocarbons in virgin olive oils of different varieties and geographical origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3278- 3283, 2001.

CERCACI, L.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G. Solid-phase extraction- thin- layer chromatography gas-chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 985, p. 211- 220, 2003.

CERT,A. Normativa International sobre el aceites de oliva y otras grasas vegetales- possible utilidad de nuevos métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, p. 175-189, jun., 1995.

CERT, A.; LANZÓN, A.; CARELLI, A. A.; AMELOTTI, G. Formation of stigmasta-3,5- diene in vegetable oils. **Food Chemistry**, Oxford, v. 49, p. 287-293, 1994.

CERT, A.; MOREDA, W.; GARCÍA-MORENO, J. Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. **Grasas Y Aceites**, Sevilla, v. 48, n. 4, p. 207- 218, 1997.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 131-148, 2000.

CIAPPELLANO, S.; SIMONETTI, P.; BRIGHENTI, F.; BERMANO, G.; TESTOLIN, G. Some nutritional benefits of extra virgin olive oil. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 45, n. 1-2, p. 48-51, 1994.

COI- CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (juillet 2003). **Huiles D'olive**. Disponível em:<<http://www.internationaloliveoil.org>> Acesso em: 17 de setembro de 2003.

DOBARGANES, C. Olive oil: analytical criteria for quality and purity evaluation. In: **INTERNATIONAL WORKSHOP ON FATS, OILS AND OILSEEDS ANALYSIS**, IUPAC, Rio de Janeiro, 2000.

DOBARGANES, M.C.; CERT, A.; DIEFFENBACHER, A. The determination of stigmastadienes in vegetable oils. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 2, 349-359, 1999.

DOURTOGLOU, V. G.; DOURTOGLOU, T.; ANTONOPOULOS, A.; STEFANO, E.; LALAS, S.; POULOS, C. Detection of olive oil adulteration using principal component analysis applied on total and regio FA content. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 80, n. 3, p. 203- 208, 2003.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. Composizione lipidica della drupa di olivo di due cultivars della zona del Chianti in funzione della maturazione. Nota ii: frazione dell'insaponificabile. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 69, p. 77- 81, feb, 1992.

FIORINO, P.; PETRUCCIOLI, G. Influenza della maturazione delle olive sul tipo e qualità dell'olio. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 54, n. 5, p. 206- 212, 1977.

GAMAZO-VÁZQUEZ, J.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J. Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters. **Food Control**, Surrey, v. 14, p. 463- 467, 2003.

GARCÍA, J. M.; YOUSFI, K.; MATEOS, R.; OLMO, M.; CERT, A. Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4231- 4235, 2001.

GIMENO, E.; CASTELLOTE, A. I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; TORRE, M. C.; LÓPEZ-SABATER, M. C. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, p. 207- 211, 2002.

GORDON, M.H.; COVELL, C.; KIRSCH, N. Detection of pressed hazelnut oil in admixtures with virgin olive oil by analysis of polar components. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 621-624, 2001.

GORDON, M.H.; FIRMAN, C. Effects of heating and bleaching on formation of stigmastadienes in olive oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1530-1532, oct, 2001.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1994. 551p.

HAUMANN, B. Olive oil – Mediterranean product consumed worldwide. **Inform**, Champaign, v.7, n. 9, p. 890- 903, 1996.

IOOC- INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. **Working paper of the Directorate- General for agriculture. The olive oil and table olives sector**. Disponível em: < http://europa.eu.int/comm/agriculture/markets/olive/index_pt.htm. Acesso em: 13 de novembro de 2003.

KECELI, T.; GORDON, M. H. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1391- 1396, 2001.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. Effect of olive collection regime on olive oil quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 35, p. 677-678, 1984.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. Olive oil: a review. **Advances in Food Research**, New York, v. 31, p. 453- 482, 1987.

LAZÓN, A.; CERT, A.; ALBI, T. Detección de la presencia de aceite de oliva refinado en el aceite de oliva virgen. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 40, n. 6, p. 385-388, 1989.

LIPWORTH, L.; MARTÍNEZ, M. E.; ANGELL, J.; HSIEH, C.; TRICHOPOULOS, D. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. **Preventive Medicine**, San Diego, v. 26, p. 181- 190, 1997.

LOGNAY, G.; SEVERIN, M.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P. J. Edible fats and oils reference materials for sterols analysis with particular attention to cholesterol. Part 1- Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. **Analyst**, London, v. 117, p. 1093- 1097, 1992.

MACHADO, C. Oliveira é alternativa de renda. **Hoje em Dia**, Belo Horizonte, 22/05/2003. Disponível em: < <http://www.hojeemdia.com.br> > Acesso em: 10/11/2003.

MARIANI, C.; VENTURINI, S. Individuazione dell'olio di girasole ad alto oleico desterolato nell'olio di oliva II. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 74, n. 11, p. 489-50, nov, 1997.

MAVROMOUSTAKOS, T.; ZERVOU, M.; BONAS, G.; KOLOCOURIS, A.; PETRAKIS, P. A novel analytical method to detect adulteration of virgin olive oil by other oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 405- 411, 2000.

MORENO, J. J.; MITJAVILA, M. T. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 14, p. 182- 195, 2003.

NERGIZ, C.; ENGEZ, Y. Compositional variation of olive fruit during ripening. **Food Chemistry**, Oxford, v. 69, p. 55- 59, 2000.

NTANIOS, F. Plant sterol-ester-enriched spreads as an example of a new functional food. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 102-106, 2001.

PARCERISA, J.; CASALS, I.; BOATELLA, J.; CODONY, R.; RAFECAS, M. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry compounds (tocopherols and sterols). **Journal of chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 149-158, 2000.

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, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas: Oliveira**. São Paulo, Nobel, 1973, 282 p.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 444- 452, out/dez, 1998.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 123- 142, 2002.

PUERTA, R.; MAESTRO-DURÁN, R.; RUÍZ-GUTIÉRREZ, V. Actividad farmacológica de la fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos aislada del aceite de oliva virgen. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 48, n. 2, p. 93- 05, 1997.

RANALLI, A.; CABRAS, P.; IANNUCCI, E.; CONTENTO, S. Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgin olive oil are affected by processing technology. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 445- 451, 2001.

RANALLI, A.; MODESTI, G.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G. The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar – I-77. **Food Chemistry**, Oxford, v. 69, p. 37- 46, 2000.

ROCHE, H.M.; GIBNEY, M.J.; KAFATOS, A.; ZAMPELAS, A.; WILLIAMS, C.M. Beneficial properties of olive oil. **Food Research International**, v. 33, p. 227-231, 2000.

RUÍZ-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.

STARK, A.H.; MADAR, Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches (Review). **Nutrition Reviews**, New York, v. 60, n. 6, p. 10-176. 2002.

TARANDJIISKA, R. B.; MAREKOV, I. N. Precise classification of virgin olive oils with various linoleic acid contents based on triacylglycerol analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 364, p. 83-91, 1998.

TOIVO, J.; PIIRONEN, V.; KALO, P.; VARO, P. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid- phase extraction in sample preparation. **Chromatographia**, v. 48, n. 11/12, p. 745- 750, 1998.

TRUJILLO-QUIJANO, J. A.; COSTA, P. Critérios de pureza em azeites de oliva. **Óleos & Grãos**. São Caetano do Sul, ano V, p. 17-24, jan/fev, 1995.

TUCK, K. L.; HAYBALL, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 636- 644, 2002.

TURATTI, J. M.; GOMES, R. A. R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos- Aspectos Funcionais e Novas Tendências**. Campinas, Cial, 2002, 67 p.

VIOLA, P. **Azeite de oliva e a saúde**. Conselho Oleícola Internacional, Madrid, 1995, 64 p.

WEBSTER, L.; SIMPSON, P.; SHANKS, A. M.; MOFFAT, C. F. The authentication of olive oil on the basis of hydrocarbon concentration and composition. **Analyst**, London, v. 125, p. 97-104, 2000.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE AZEITES DE OLIVA IMPORTADOS DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO DE CAMPINAS.

Becker, D. F. S.; Gonçalves, L. A. G; Moreira, R.N.C.

Artigo em fase de conclusão para enviar para publicação na Revista
“Brazilian Journal of Food Technology”.

CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE AZEITES DE OLIVA IMPORTADOS DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO DE CAMPINAS.

RESUMO

O Brasil não produz azeite de oliva, sendo por isto um importador potencial de países como a Argentina, Espanha, Itália e Portugal. Visto que tem sido crescente a detecção de fraudes em azeites de oliva virgem e o controle analítico no país é quase inexistente, o presente trabalho avalia a identidade e qualidade de 29 marcas de azeite de oliva disponíveis no comércio de Campinas, importados dos países acima mencionados, nas categorias de azeite de oliva extra virgem (15), azeite de oliva (10) e azeite de oliva puro (4), categoria esta não presente na legislação em vigor no Brasil (Resolução nº 482 da ANVISA). Os azeites foram submetidos inicialmente ao teste de acidez e medida do coeficiente de extinção específica no ultravioleta a 232 e 270 nm. O grau de acidez de todas as amostras mostrou-se dentro dos limites estabelecidos para a classificação do tipo de azeite. No entanto, o coeficiente de extinção específica a 232 e 270 nm de 11 marcas apresentou absorção acima dos valores limites recomendados na legislação para a categoria do azeite. O segundo passo foi submeter as amostras à determinação da composição em ácidos graxos e diante dos resultados encontrados ainda foram avaliados os índices de iodo e saponificação, bem como o percentual de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e isômeros trans. Nesta etapa, foram detectadas 4 marcas irregulares em função do baixo teor de ácido oléico e elevado conteúdo de ácido linoléico e linolênico. Além da evidente irregularidade na composição em ácidos graxos, o índice de iodo, o percentual de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados e a presença de isômeros trans em algumas marcas confirmaram a adulteração grosseira destas amostras com outro óleo vegetal.

1 INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é um dos poucos óleos vegetais que pode ser consumido sem tratamento industrial de refino. Seu grau moderado de insaturação, isto é, a prevalência em sua constituição do ácido oléico, monoinsaturado, é considerado nutricionalmente preferível frente aos graus mais elevados de insaturação de outros óleos comestíveis, principalmente no controle do colesterol plasmático.

A prática de misturar óleos ao azeite de oliva para baixar custos sempre foi adotada por empresas tanto nacionais como nos países de origem, e atualmente prefere-se utilizar óleos com alto teor de ácido oléico. Entretanto, os padrões de identidade e qualidade para os óleos e gorduras comestíveis e os parâmetros para eles estabelecidos, fazem com que apenas as fraudes grosseiras possam ser detectadas pelos laboratórios de controle de qualidade.

Por estas razões, tem-se como objetivo neste trabalho avaliar a identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva, considerando os parâmetros analíticos recomendados pela legislação vigente no Brasil. Foram determinados os índices de acidez, iodo e saponificação, o coeficiente de extinção específica no ultravioleta a 232 e 270 nm e a composição em ácidos graxos, com o objetivo de detectar possível adulteração do azeite com outros óleos vegetais, bem como a adição do próprio óleo de oliva refinado ou obtido por processos de extração não coerentes com a especificação do tipo de azeite apresentada no rótulo.

A acidez é um índice de qualidade do azeite de oliva que está estritamente relacionado à classificação do azeite por tipos. Valores distintos de índice de acidez são estabelecidos para os diferentes tipos de azeite de oliva, classificados através dos processos de obtenção (extração mecânica e/ou extração por solventes), se sofreram refino industrial ou se são misturas. Vários fatores influenciam a acidez, como a maturação e estocagem da azeitona, ação

enzimática e qualidade da azeitona, isto é, se está infestada, machucada ou fermentada (PEIXOTO; SANTANA; ABRANTES, 1998).

Para se avaliar a adição de óleo de oliva refinado ao azeite de oliva virgem são estabelecidos limites para o valor do coeficiente de extinção específica no ultra violeta nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. A absorção de luz ultravioleta a 232 nm determina o nível de duplas ligações conjugadas e de hidroperóxidos do ácido linoléico misturados aos produtos cetônicos provenientes da oxidação secundária dos lipídeos. Já os trienos conjugados absorvem no comprimento de onda de 270 nm (ANTONIASSI, et al., 1998; CERT, 1995).

A determinação da composição em ácidos graxos é uma das principais análises utilizadas na detecção de adulterantes no azeite. Por outro lado, pode-se preparar facilmente uma mistura de óleos que se enquadre dentro dos limites encontrados nos azeites de oliva. Portanto, a dificuldade de se condenar uma amostra de azeite somente pela sua composição em ácidos graxos está na grande amplitude entre os limites inferior e superior estabelecidos na legislação.

Segundo Codex Alimentarius (Codex, 1979 e 1987), a composição em ácidos graxos do azeite de oliva [percentual (mol/mol) dos ésteres metílicos] seria de: ácido oléico (55,0 – 83,0), ácido palmítico (7,5 – 20,0), ácido linoléico (3,5 – 21,0), ácido esteárico (0,5 – 5,0), ácido palmitoléico (0,3 – 3,5), ácido linolênico (0,0 – 1,5), ácido mirístico (0,0 – 0,05) e outros ácidos graxos em quantidades diminutas (GUNSTONE; HARWOOD; PADLEY, 1994).

De acordo com o Regulamento da Comunidade Económica Europeia (CEE/ 3568 / 91) e a Resolução nº 482 da ANVISA, o limite máximo estabelecido para o ácido linolênico em azeites de oliva é de 0,9%. Para os outros ácidos graxos os teores correspondem aos estabelecidos no Codex Alimentarius (ANVISA, 1999; CERT, 1995).

Segundo Haumann (1996), a região, o clima, a variedade e a maturidade dos frutos colhidos afetam a composição em ácidos graxos. Azeites provenientes da Espanha, Itália e Grécia geralmente têm baixos teores de ácidos linoléico e palmítico e alto teor de ácido oléico. Já os produzidos na Tunísia têm alto teor de ácidos linoléico e palmítico e menor em ácido oléico.

Trujillo-Quijano e Costa (1995) relataram que a cromatografia gasosa de alta resolução com coluna capilar é a técnica mais apropriada para a determinação da composição em ácidos graxos. A clara separação dos isômeros trans dos ácidos graxos com esta metodologia possibilita a detecção de adulteração do azeite com óleos parcialmente hidrogenados .

A composição em ácidos graxos é tradicionalmente utilizada pela indústria de alimentos como indicativo de pureza, embora uma ampla variação em óleos comestíveis de diferentes origens geográficas seja um fator limitante na interpretação dos dados. Alguns tipos de contaminação podem ser detectados, ou pelo menos dar indício da presença de misturas. O teor de ácido linoléico e a relação entre ácido oléico e linoléico foram utilizados para detectar mistura de azeite de oliva virgem com 5-10% de óleos de semente refinados (APARICIO; APARICIO-RUIZ, 2000).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Azeite de oliva

Vinte e nove amostras de azeite de oliva foram adquiridas no comércio de Campinas, no período de março a maio de 2003. Para cada marca adquiriu-se duas embalagens do mesmo lote.

Os azeites foram procedentes da Argentina, Espanha, Itália e Portugal, sendo 15 marcas identificadas pelo fabricante como azeite de oliva extra virgem, 10 como azeite de oliva e 4 como azeite de oliva puro.

Estas informações estão resumidamente dispostas nas tabelas 1, 2 e 3, separadas pela classificação especificada na embalagem dos produtos. Constam também a acidez, o país de origem, local de envase e empresa importadora e distribuidora no Brasil. Todas estas informações foram retiradas do rótulo dos azeites analisados.

O nome comercial das amostras de azeite foi substituído por letras. As amostras de mesma marca que apresentavam diferença na categoria do azeite e/ou volumes variados, foram diferenciadas por números.

Tabela 1- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Extra Virgem

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAÍS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
A	até 1,0%	Portugal	Origem	SS Borges
B1	—	Itália	Origem	Expand Importadora Ltda
C	até 0,5%	Itália	Origem	Mediterrâneo Ind. Com. Imp. Exp. Ltda
D1	até 1%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
D2	até 1%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
E1	até 1,0%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
F1	—	Itália	Origem	Colavita Brasil Com. Imp. Exp. Ltda
H	até 0,7%	Portugal	Origem	Qualimpor, Ltda.
L1	até 0,75%	Espanha	Origem	Cargill Agrícola, S. A
M	até 1%	Espanha	Origem	La Violetera
N1	até 1%	Itália	Origem	La Violetera
N2	até 1%	Itália	Origem	La Violetera
P1	—	Argentina	Origem	Mad Product Distribuidora Ltda
R1	até 0,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
T	—	Portugal	Origem	SS Borges

(-) Dados não declarados na embalagem do produto.

D1 e D2, mesma marca, apresentada em 250 e 500 mL, respectivamente

N1 e N2, mesma marca, contendo Alecrim e Orégano, respectivamente.

Tabela 2- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAÍS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
D3	—	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
D4	até 1,5%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
G	—	Argentina	Origem	Paladar, Ltda
I	—	Portugal	Brasil (Paladar)	Paladar, Ltda
J	—	Portugal	Origem	Unilever Bestfoods Brasil Ltda
L2	até 1,0%	Espanha	Origem	Cargill Agrícola, S. A
P2	—	Argentina	Origem	Mad Product Distribuidora Ltda
Q	—	Espanha	Origem	Bunge Alimentos S.A
R2	até 1,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
S	até 1,5%	Portugal	Brasil (Vida Alimentos)	Vida Alimentos Ltda

(-) Dados não declarados na embalagem do produto.

D3 e D4, mesma marca, sendo D3 denominada “Suave Sabor”.

Tabela 3- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Puro

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAÍS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
B2	—	Itália	Origem	Expand Importadora Ltda
E2	até 1,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
F2	—	Itália	Origem	Colavita Brasil Com. Imp. Exp. Ltda
O	até 1,1%	Itália	Origem	Tirreno Ind. Com. Imp. E Exp. Ltda

(-) Dados não declarados na embalagem do produto

Com base na legislação brasileira que regulamenta o setor de óleos de origem vegetal (Resolução nº 482 da ANVISA)- ANEXO I, a classificação do azeite de oliva varia em função do processo de obtenção do óleo e da acidez do azeite de oliva designado como virgem, por ser um azeite extraído por prensagem a frio do fruto da oliveira.

A classificação do azeite de oliva como “azeite extra virgem” significa dizer que o óleo foi obtido por processos mecânicos de extração e o mesmo possui acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,0 g/100g. A determinação “azeite de oliva”, por outro lado, é uma mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem, podendo ser extra, fino ou comum, em função da acidez (ANEXO 1).

A determinação “azeite de oliva puro” não se encaixa na classificação em vigor no país, ficando em aberto a especificação destas marcas. Os parâmetros avaliados neste trabalho foram comparados posteriormente com a legislação para se determinar o tipo de azeite condizente com especificação presente no rótulo.

2.2 Métodos

Foram realizadas as seguintes determinações analíticas recomendadas pela legislação para controle da identidade e pureza de azeites de oliva.

- % de Ácidos graxos livres (% AGL): AOCS Ca 5 a- 40 (2002)

- Coeficiente de Extinção Específica: AOCS Ch 5-91 (2002)
- Composição em ácidos graxos: AOCS Ce 1-62 (2002)
- Índice de Iodo calculado: AOCS Cd 1c-85 (2002)
- Índice de Saponificação calculado: AOCS Cd 3 a-94 (2002)

Determinação da composição em ácidos graxos: utilizou-se a metodologia de preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos com BF_3 (fluoreto de boro em metanol) da AOCS Ce 2-66, adaptado por Maia (1992). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa utilizando cromatógrafo a gás, marca CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, com coluna capilar de sílica fundida (DB-23 Agilent, 50% cianopropil- metilpolisiloxano, 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura do filme). A programação de temperatura na coluna foi de 195°C por 20 minutos, 195 a 215°C (5°C/ minuto) e 215°C por 16 minutos, totalizando 40 minutos de corrida. A temperatura do detector foi de 280°C e do injetor de 250°C; fluxo do gás de arraste (He) foi estabelecido em 1,0 mL/min, o volume injetado de 1 μL e split, na razão de 50:1. A identificação dos picos foi feita por comparação com o tempo de retenção de ácidos graxos de amostras de óleos vegetais de composição conhecida, injetadas nas mesmas condições.

Esta coluna é apropriada para separar os diferentes isômeros trans de amostras possivelmente adulteradas com óleos vegetais de outras origens ou mal processados. Portanto, auxilia em mais este dado de detecção de fraude.

Determinação do coeficiente de extinção específica: utilizou-se um espectrofotômetro Lambda 20 Perkin Elmer UV/ Visível. As determinações foram realizadas nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm, sendo a amostra dissolvida em isooctano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se inicialmente a determinação da acidez expressa como % de ácidos graxos livres (em ácido oléico), e o coeficiente de extinção específico.

Os resultados estão dispostos nas tabelas 4, 5 e 6, agrupadas de acordo com a classificação dos azeites.

Tabela 4- Acidez (% AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.

MARCAS	% AGL	K232	K270
RESOLUÇÃO nº 482	M 1,00	M 2,50	M 0,2
A	0,57	2,19	0,23
B1	0,36	<u>2,81</u>	<u>0,42</u>
C	0,22	<u>5,07</u>	<u>4,45</u>
D1	0,43	2,34	0,20
D2	0,55	1,93	0,05
E1	0,61	2,04	0,13
F1	0,61	<u>2,80</u>	<u>0,56</u>
H	0,50	1,89	0,17
L1	0,59	2,10	0,27
M	0,35	1,86	0,10
N1	1,02	2,21	<u>0,30</u>
N2	0,92	2,51	<u>0,42</u>
P1	1,01	2,72	<u>0,35</u>
R1	0,36	2,13	<u>0,33</u>
T	0,54	2,09	0,20

(M) Limite máximo permitido pela Resolução nº 482 da ANVISA.

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D1 e D2, mesma marca, apresentada em 250 e 500 mL, respectivamente

N1 e N2, mesma marca, contendo Alecrim e Orégano, respectivamente.

Tabela 5- Acidez (% AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das 10 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.

MARCAS	% AGL	K 232	K270
RESOLUÇÃO n° 482	M 1,50	M 3,30	M 1,00
D3	0,27	1,97	0,23
D4	0,67	2,08	0,24
G	0,15	<u>3,93</u>	1,04
I	0,57	<u>3,87</u>	0,74
J	0,3	2,16	0,36
L2	0,57	2,67	0,59
P2	0,79	2,97	<u>1,35</u>
Q	0,59	2,41	0,43
R2	1,37	2,28	0,48
S	1,24	3,39	0,48

(M) Limite máximo permitido pela Resolução nº 482 da ANVISA.

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D3 e D4, mesma marca, sendo D3 denominada “Suave Sabor”.

Tabela 6- Acidez (% AGL) e coeficiente de extinção específica (K 232 e K 270) das 4 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.

MARCAS	% AGL	K 232	K 270
B2	0,09	2,41	0,80
E2	0,39	2,34	0,26
F2	0,84	2,90	0,75
O	0,13	5,61	5,50

Segundo Aued-Pimentel (1991) e Peixoto (1998), a acidez é um parâmetro clássico utilizado na classificação dos diferentes tipos de azeite e é importante para avaliar as alterações sofridas pelo óleo, em consequência de tratamentos industriais ou de conservação inadequada. A % AGL determina o teor de ácidos graxos livres resultantes da hidrólise dos triglicerídeos, e é expresso convencionalmente em porcentagem de ácido oléico.

A acidez para as amostras analisadas variou de 0,09 a 1,37. Segundo Antoniassi e colaboradores (1998), os baixos índices são indicativos de adição de óleo refinado, possivelmente da própria oliva.

Os valores obtidos para a determinação dos ácidos graxos livres possuem um coeficiente de variação (CV) menor que 5%. Para a determinação do coeficiente de extinção específica a 232 nm o CV foi menor que 10% e a 270 nm menor que 20%.

Segundo a Resolução nº 482 da ANVISA, o azeite de oliva refinado deve apresentar uma acidez máxima de 0,5 em ácido oléico (g/ 100g). Logo, não é possível confirmar a adição deste tipo de azeite ao azeite extra virgem através da acidez, uma vez que para extra virgem o máximo permitido é de 1,0 g/ 100g.

Pode-se observar na Tabela 4 que a marca C, embora tenha apresentado %AGL dentro do limite estabelecido, a acidez muito baixa para um azeite extra virgem sugere fraude com óleo refinado. Tal suspeita pode ser sustentada considerando o coeficiente de extinção específica que está acima do recomendado.

No entanto, os valores determinados para a AGL(%) nas amostras analisadas encontram-se dentro do valor estabelecido para a classificação em questão. É possível considerar que o valor máximo permitido para azeite de oliva é pouco elucidativo no caso de fraude de um azeite extra virgem com azeite refinado.

Os azeites extra virgem das marcas C, B1 e F1 apresentaram coeficiente de extinção específica (K) a 232 nm mais alto que o limite para este tipo de azeite. O mesmo foi observado na marca G e I, ambos azeite de oliva, e O, marca com classificação não especificada na legislação brasileira. Isto indica a presença de óleo refinado no azeite de oliva extra virgem, e a denominação de azeite puro possivelmente refere-se a um azeite de oliva refinado.

As marcas B1, C, F1, N1, N2, P1 e R1, todas classificadas como azeite de oliva extra virgem, e as marcas P2 e O, classificados como azeite de oliva e azeite puro, respectivamente, apresentaram absorvidade elevada no comprimento de onda de 270 nm. Segundo Aued-Pimentel (1991), nos azeites que sofreram aquecimento observa-se no ultravioleta um máximo de absorção bem definido ao redor de 270 nm, em função da presença de produtos secundários da oxidação do óleo.

A absorção a 232 nm é originária da absorção de dienos e a 270 nm se deve aos trienos conjugados. Os sistemas trienólicos conjugados formam-se a partir dos ácidos linoléico e linolênico. A formação destes compostos é atribuída à desidratação de compostos epóxidos diinsaturados, resultantes do processo de oxidação dos óleos e pela ação de terras clarificantes (AUED-PIMENTEL, 1991).

De acordo com a Resolução nº 482, para verificar a presença de óleos refinados, quando o coeficiente de extinção específica a 270 nm exceder o limite da categoria correspondente, deve-se proceder a determinação de K₂₇₀ após passagem da amostra em coluna de alumina.

Visto a grande dificuldade de se caracterizar um azeite somente por estas determinações, as amostras foram submetidas à determinação da composição em ácidos graxos, com identificação dos isômeros trans. A partir desta composição, calculou-se os índices de iodo e de saponificação, dados que complementam a caracterização da identidade e pureza das amostras.

Todas as preparações de éteres metílicos foram feitas em duplicata. A composição em ácidos graxos foi realizada com uma única injeção de cada duplicata, tomando-se os valores médios como resultado. A triplicata neste caso foi necessária apenas para injeções cujos resultados deram coeficiente de variação maior que 5%.

Os resultados obtidos nas 29 marcas analisadas estão dispostos nas Tabelas 7 a 12, agrupados por categoria do azeite.

Tabela 7- Composição em ácidos graxos das 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.

AMOSTRAS	COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS								
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
Resolução nº 482	7,5 - 20,0	0,3 - 3,5	0,5 - 5,0	55,0 - 83,0	3,5 - 21,0	< 0,9	< 0,6	< 0,4	< 0,2
A	10,0	0,8	3,3	76,9	6,9	1,0	0,4	nd	0,15
B1	10,2	0,8	3,3	75,7	7,2	0,7	0,5	nd	0,14
C	11,3	0,1	4,5	<u>24,4</u>	<u>49,6</u>	<u>6,4</u>	0,4	0,2	<u>0,40</u>
D1	11,2	1,0	3,1	75,0	8,0	0,7	0,4	nd	0,13
D2	10,6	0,8	3,3	77,8	5,9	0,7	0,4	nd	0,12
E1	10,5	0,8	2,9	75,3	8,4	0,8	0,4	0,3	0,13
F1	10,8	0,7	2,9	75,7	8,4	0,7	0,4	0,3	nd
H	11,2	1,0	2,9	76,6	6,5	0,7	0,4	0,3	0,13
L1	10,2	0,6	3,3	78,1	5,9	0,7	0,4	0,3	nd
M	10,8	0,8	3,3	77,6	5,7	0,7	0,4	0,3	0,13
N1	11,4	1,0	3,4	75,0	7,4	0,7	0,4	0,3	0,15
N2	10,6	0,8	3,1	75,3	8,3	0,7	0,5	0,3	0,15
P1	14,7	1,7	1,9	66,4	13,4	0,8	0,4	0,3	0,13
R1	10,8	0,8	3,3	73,6	7,9	0,7	0,4	0,3	0,13
T	10,9	0,9	3,3	78,7	4,3	0,6	0,5	0,3	0,13

(nd) Não detectado.

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D1 e D2, mesma marca, apresentada em 250 e 500 mL, respectivamente

N1 e N2, mesma marca, contendo Alecrim e Orégano, respectivamente.

Tabela 8- Composição em ácidos graxos das 10 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS									
AMOSTRAS	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
Resolução nº 482	7,5 - 20,0	0,3 - 3,5	0,5 - 5,0	55,0 - 83,0	3,5 - 21,0	< 0,9	< 0,6	< 0,4	< 0,2
D3	9,8	0,8	4,0	60,2	5,9	0,6	0,5	nd	nd
D4	11,2	0,8	3,4	78,8	5,5	0,6	0,4	nd	nd
G	11,4	0,1	3,5	24,3	52,7	6,0	0,4	0,2	0,50
I	11,8	0,3	3,5	28,6	48,3	5,3	0,4	0,2	0,50
J	10,8	0,7	3,2	76,9	6,7	0,7	0,4	0,3	nd
L2	11,6	0,8	3,4	77,4	5,2	0,6	0,4	0,3	nd
P2	8,9	0,5	2,8	75,0	11,8	0,4	0,3	0,3	nd
Q	11,4	0,8	3,2	77,2	5,6	0,6	0,4	0,3	0,13
R2	10,9	0,8	3,3	77,6	5,6	0,7	0,4	0,3	0,13
S	13,9	1,4	2,2	70,4	10,1	0,9	0,4	0,3	nd

(nd) Não detectado.

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D3 e D4, mesma marca, sendo D3 denominada “Suave Sabor”.

Tabela 9- Composição em ácidos graxos das 4 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS									
AMOSTRAS	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
Resolução nº 482	7,5 - 20,0	0,3 - 3,5	0,5 - 5,0	55,0 - 83,0	3,5 - 21,0	< 0,9	< 0,6	< 0,4	< 0,2
B2	12,9	1,2	2,8	70,5	10,3	0,8	0,5	nd	0,14
E2	11,0	0,8	3,2	77,6	5,8	0,7	0,4	0,3	nd
F2	12,2	1,1	2,8	74,0	9,3	0,7	0,4	0,3	0,14
O	11,1	3,4	3,4	23,7	54,0	5,4	0,4	0,2	0,50

(nd) Não detectado.

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

Tabela 10- Índice de iodo, Índice de saponificação, percentual de ácido graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 15 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem” analisadas.

AMOSTRAS	Í. Iodo	Í. Saponif.	Monoinsaturados	Poliinsaturados	Isôm. Trans	
Resolução nº 482	(75-94)	(184-196)	(%)	(%)	(a)	(b)
A	81	193	77,7	7,9	nd	
B1	80	195	76,4	7,9	nd	
C	<u>124</u>	<u>198</u>	<u>24,7</u>	<u>56,0</u>	<u>0,7</u>	<u>1,7</u>
D1	81	193	76,0	8,7	nd	
D2	80	193	78,6	6,6	nd	
E1	82	193	76,4	9,2	nd	
F1	82	192	76,7	9,1	nd	
H	80	193	77,9	7,2	nd	
L1	80	193	79,0	6,6	nd	
M	79	192	78,7	6,4	nd	
N1	80	193	76,3	8,1	nd	
N2	82	192	76,4	9,0	nd	
P1	84	193	68,4	14,2	nd	
R1	80	196	74,7	8,6	nd	
T	78	193	79,9	4,9	nd	

(a) Soma dos isômeros transolêicos (%)

(b) Soma dos isômeros translinolêicos + translinolênicos (%)

(nd) Não detectado

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D1 e D2, mesma marca, apresentada em 250 e 500 mL, respectivamente

N1 e N2, mesma marca, contendo Alecrim e Orégano, respectivamente.

Tabela 11- Índice de iodo, Índice de saponificação, percentual de ácido graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 10 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva” analisadas.

AMOSTRAS	I. Iodo	I. Saponif.	Monoinsaturados	Poliinsaturados	Isôm. Trans
Resolução nº 482	(75-94)	(184-196)	(%)	(%)	(a)
D3	64	233	61,0	6,5	nd
D4	80	191	79,6	6,1	nd
G	128	194	24,6	58,7	1,0
I	123	195	29,1	53,6	1,1
J	80	193	77,9	7,4	nd
L2	78	193	78,5	5,8	nd
P2	87	192	75,8	12,2	nd
Q	79	193	78,3	6,2	nd
R2	79	192	78,7	6,3	nd
S	82	193	72,1	11,0	nd

(a) Soma dos isômeros translinolêicos + translinolênicos (%)

(nd) Não detectado

* Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

D3 e D4, mesma marca, sendo D3 denominada “Suave Sabor”.

Tabela 12- Índice de iodo, Índice de saponificação, percentual de ácido graxos monoinsaturados, poliinsaturados e de isômeros trans nas 4 marcas de azeite identificadas como “Azeite de Oliva Puro” analisadas.

AMOSTRAS	I. Iodo	I. Saponif.	Monoinsaturados	Poliinsaturados	Isôm. Trans
Resolução nº 482	(75-94)	(184-196)	(%)	(%)	(a)
B2	82	194	71,7	11,1	nd
E2	80	192	78,7	6,5	nd
F2	83	191	75,4	10,0	nd
O	131	189	27,3	59,4	1,1

(a) Soma dos isômeros translinolêicos + translinolênicos (%)

(nd) Não detectado

Diante dos resultados da composição em ácidos graxos é possível afirmar que as marcas C, G, I e O apresentaram adulteração grosseira com outros óleos vegetais. O baixo teor de ácido oléico, associado ao alto teor dos ácidos linolêico e linolênico representa uma clara evidência da adição de outro óleo, possivelmente óleo de soja. Logo, a classificação descrita no rótulo destas quatro marcas não

está de acordo com a característica de identidade, seja qual for a sua classificação.

Segundo Haumann (1996) e Tarandjiska e Marekov (1998), o azeite de oliva virgem normalmente contém 60-80% de ácido oléico. A Resolução nº 482 (2000) que regulamenta o setor de óleos no Brasil também recomenda um limite de 55-83% de ácido oléico, 3,5- 21,0% para linoléico e teor menor que 0,9% para linolênico.

Observou-se ainda que nestas 4 marcas o teor de isômeros trans está acima dos limites estabelecidos pela norma vigente (ANEXO I), o que confirma a irregularidade na classificação destes azeites e fraude com outros óleos.

A presença de isômeros trans dos ácidos oléico, linoléico e linolênico em azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva, acima dos níveis máximos, pode indicar adulteração com óleos de semente hidrogenados, azeite de oliva esterificado, azeite de oliva virgem tratado ilegalmente, ou óleos geneticamente modificados ou desesterolizados a altas temperaturas (APARICIO; APARICIO-RUIZ, 2000).

Complementando os resultados discutidos, o índice de iodo calculado para as 4 marcas mencionadas anteriormente apresentou valores acima do permitido na legislação vigente. O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação de um óleo ou gordura, e na prática é calculado pela quantidade de halogênio absorvida e , convencionalmente é expresso como peso de iodo absorvido por 100 g de óleo ou gordura. Entretanto este índice pode ser determinado a partir das porcentagens relativas dos ácidos graxos insaturados que constituem o óleo em estudo. Para este fim, utiliza-se uma fórmula teórica obtida da estequiometria da reação do iodo com os ácidos graxos insaturados.

Pela porcentagem de monoinsaturados e poliinsaturados verificou-se a não coerência dos resultados para estas 4 marcas citadas, mostrando um teor muito baixo de monoinsaturados comparados aos azeites com composição dentro dos limites estabelecidos.

Antoniassi e outros (1998) analisaram 44 amostras de azeite de oliva e de óleo composto de soja/oliva. A determinação da composição em ácidos graxos foi muito útil para se detectar a adição de óleos hidrogenados, mas não pode ser utilizada como único critério para se avaliar o padrão de identidade do azeite de oliva, pois dependendo do nível e do óleo utilizado, a adulteração só será percebida pela composição em esteróis.

Segundo Peixoto (1998), a dificuldade de se condenar uma amostra pela sua composição em ácidos graxos está na grande amplitude entre os limites máximo e mínimo contemplados na legislação.

A determinação da composição em ácidos graxos, associada aos índices de acidez, iodo e saponificação e ao coeficiente de extinção específica permite identificar algumas marcas grosseiramente fraudadas. No entanto, ainda é preciso avaliar outros parâmetros para assegurar a legitimidade dos azeites que apresentaram algumas incoerências com a categoria expressa na embalagem.

As marcas C, G, I e O podem ser consideradas adulteradas com outro óleo vegetal. As demais marcas foram submetidas à determinação da composição em fitosteróis, como tentativa de detectar fraude por adição de outro óleo, e os resultados serão apresentados em outro trabalho.

4 CONCLUSÃO

As 29 marcas de azeite de oliva analisadas apresentaram % de ácidos graxos livres dentro do limite estabelecido para a categoria de cada amostra. No entanto, a absorvidade no ultravioleta a 232 e 270 nm demonstrou irregularidades em onze marcas (B1, C, F1, G, I, N1, N2, O, P1, P2 e R1).

Considerando os dados disponíveis insuficientes para se concluir fraude por adição de outros óleos vegetais, a determinação da composição em ácidos graxos permitiu detectar a adulteração grosseira em quatro marcas de azeite (C, G, I e O). Isômeros trans que jamais devem ser detectados em azeites de oliva, foram encontrados nestas 4 marcas, sendo que uma delas apresentou índice de iodo próximo ao de óleo de soja, denotando uma fraude evidente, sem necessidade de qualquer análise complementar.

Neste trabalho observou-se que há disponível no mercado azeites com categoria não condizente com a declarada na embalagem. Esta irregularidade foi detectada por técnicas analíticas rotineiras de controle de qualidade. No entanto, fraudes mais aprimoradas não foram confirmadas nesta primeira etapa de caracterização.

Para complementar a detecção de fraudes nas demais amostras analisadas faz-se necessário completar a avaliação com a quantificação de fitosteróis, tema que será discutido no próximo capítulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIASI, R.; PEREIRA, D. A.; SZPIZ, R. R.; JABLONKA, F. H.; LAGO, R. C. A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 1, n. 1, 2, p. 32-43, jan/ dez, 1998.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, Brasília, nº 3029, 1999.

AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign, 2002.

APARICIO, R.; APARICIO-RUIZ, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 93- 104, 2000.

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

CERT, A. Normativa International sobre el aceites de oliva y otras grasas vegetales- posible utilidad de nuevos métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, p. 175-189, jun., 1995.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1994. 551p.

HAUMANN, B. Olive oil – Mediterranean product consumed worldwide. **Inform**, Champaign, v.7, n. 9, p. 890- 903, 1996.

MAIA, E. L. **Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce**. 1992. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 444- 452, out/dez, 1998.

TARANDJIISKA, R. B.; MAREKOV, I. N. Precise classification of virgin olive oils with various linoleic acid contents based on triacylglycerol analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 364, p. 83-91, 1998.

TRUJILLO-QUIJANO, J. A.; COSTA, P. Critérios de pureza em azeites de oliva. **Óleos & Grãos**. São Caetano do Sul, ano V, p. 17-24, jan/fev, 1995.

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM AZEITE DE OLIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Becker, D. F. S.; Gonçalves. L. A. G; Fernandes, G. B.

Artigo em fase de conclusão para enviar para publicação na Revista **“Brazilian Journal of Food Technology”**.

QUANTIFICAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM AZEITE DE OLIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

RESUMO

Neste trabalho foram testadas condições analíticas para adequação da metodologia de determinação de fitosteróis aplicada ao azeite de oliva. A técnica para obtenção da fração esterólica engloba a saponificação do azeite de oliva adicionado de padrão interno, isolamento dos esteróis por cromatografia em camada delgada (CCD), extração dos esteróis da sílica gel e injeção do resíduo sem derivatização em cromatógrafo em fase gasosa equipado com coluna capilar LM-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxane, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,3 μ m de espessura de filme). Diante da condição cromatográfica estipulada (isoterma de 300°C) obteve-se boa resolução dos componentes, que puderam ser identificados e quantificados através da relação direta com a área do padrão interno, de concentração conhecida, ou por meio de uma curva de padronização interna, sendo que ambos mostraram resultados semelhantes. Assim, foi possível avaliar a identidade de 25 marcas de azeites de oliva disponíveis no comércio de Campinas, importados da Argentina, Espanha, Itália e Portugal, sendo que 24 destas foram envasadas na origem. As determinações foram realizadas em duplicata, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 10% entre elas. O resultado do percentual dos principais fitosteróis mostrou que é possível detectar fraude no azeite de oliva com outros óleos vegetais, em função do teor de Beta-sitosterol que deve ser no mínimo 93%, segundo a Resolução nº 482 da ANVISA. Através do teor de esteróis totais, associado à composição em esteróis, foi possível detectar adulterações nos azeites analisados.

1 INTRODUÇÃO

A determinação de esteróis é uma das técnicas mais empregadas na detecção de adulteração de azeites de oliva. Como todas as metodologias, sempre se requer técnicas complementares para o julgamento da genuinidade de um azeite. Uma das razões é que, dependendo do processamento pode-se remover grande parte dos esteróis, e estes óleos ao serem misturados ao azeite passam despercebidos na análise da fração esterólica. A determinação dos subprodutos de degradação da matéria insaponificável e glicerídica são ferramentas muito úteis para detecção de óleos tratados para conter baixo teor de esteróis. Os principais produtos de degradação dos esteróis são: estigmasta-3,5-dieno, estigmastatrieno, campestadieno e campestatrieno, estes formados a partir do beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol e brassicasterol, respectivamente (TRUJILLO-QUIJANO, COSTA, 1995).

Os esteróis são conhecidos por possuírem uma ampla faixa de atividades biológicas e propriedades físicas. Os fitosteróis, por exemplo, são produtos importantes para a saúde e para a indústria de alimentos. Estes são muito utilizados como emulsificantes em cosméticos e fornecem a maior parte dos intermediários esteroidais e precursores para a produção de hormônios farmacêuticos. Um número grande de fitosteróis com estruturas específicas são conhecidos por inibirem a deterioração oxidativa de óleos, servindo como agente antipolimerizante em óleos de fritura. Também tem sido documentada a atividade hipocolesterolêmica de alguns fitosteróis. Os análogos saturados dos fitosteróis e seus ésteres têm sido relatados como agentes efetivos na diminuição do colesterol plasmático, oferecendo benefícios à saúde (DUTTA; NORMÉN, 1998; ABIDI, 2001).

Os fitosteróis diminuem os níveis de colesterol sérico por diminuir a absorção intestinal do colesterol endógeno e do proveniente da dieta, com um

conseqüente aumento da excreção fecal de colesterol. Até o presente momento, acredita-se que a redução da solubilidade do colesterol nos sais biliares seja o principal fator que ocasiona uma diminuição da absorção deste pelo intestino, causada por uma competição e/ou co-precipitação dos fitosteróis com o colesterol intestinal (NTANIOS, 2001).

O azeite de oliva apresenta composição em esteróis bastante particular, que tem sido utilizada para detectar adulteração com outros óleos. Segundo Antoniassi e colaboradores (1998), nos trabalhos realizados no Brasil para avaliação da qualidade ou adulteração do azeite de oliva, a composição em esteróis não estava sendo considerada, provavelmente por se tratar de uma análise longa e de alto custo.

Segundo Abidi (2001), para avaliar a mistura de fitosteróis com uma diversidade de outros componentes não saponificáveis em alimentos lipídicos e óleos vegetais é preciso utilizar técnicas analíticas seguras para extração, isolamento, separação, purificação, detecção e quantificação dos analitos. O isolamento e concentração dos esteróis presentes na matriz requer extração com solvente, extração por fluido supercrítico, ou fracionamento por fluido supercrítico seguido de várias etapas de limpeza e processos cromatográficos. Para subsequente caracterização e quantificação a fração isolada pode ser purificada e isolada por ampla variedade de técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna, cromatografia em fase gasosa, CCD, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase normal ou em fase reversa. Os esteróis podem ser detectados por detector de ionização de chama, detector de ultravioleta (UV), detector de infravermelho, detecção por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Com o advento de tecnologias sofisticadas, a complexa mistura de esteróis pode ser eficientemente separada.

Toivo e colaboradores (1998) desenvolveram um método para identificar e quantificar esteróis em óleos vegetais e na gordura do leite. Após saponificação da amostra os autores adicionaram betulina como padrão interno e procederam a extração da fração de esteróis utilizando coluna aberta de fase reversa C₁₈. Os esteróis foram derivatizados e determinados por cromatografia em fase gasosa. Para quantificação foi preparada uma curva de calibração. Esta metodologia é mais rápida e consome menos solvente orgânico que a metodologia convencional que utiliza CCD como etapa de purificação da matéria insaponificável.

Recentemente, Verleyen e colaboradores (2002) determinaram o conteúdo de esteróis totais em vários óleos vegetais utilizando saponificação dos óleos contendo betulina como padrão interno, extração da matéria insaponificável e derivatização da fração insaponificável. Esta fração foi encaminhada diretamente para a separação de seus componentes por cromatografia em fase gasosa. Os esteróis livres e esterificados foram separados em coluna de sílica gel, obedecendo suas diferentes polaridades. Os esteróis livres são mais polares que os esterificados. Ambas as frações foram saponificadas, derivatizadas e as quantificações feitas por cromatografia em fase gasosa. Os dados obtidos indicaram que é possível separar esteróis livres e esterificados com uma quantidade mínima de solvente em coluna de sílica gel. A grande dificuldade é ajustar a polaridade do solvente para a primeira extração (PHILLIPS, et al., 2002).

Pretende-se neste trabalho testar a metodologia para determinação e quantificação de fitosteróis em azeites de oliva, onde será considerada a eficiência do processo de extração dos esteróis das amostras, a capacidade da coluna em separar com boa resolução os componentes esterólicos e o uso de padrão interno como compensador das perdas do analito que ocorrem durante as várias etapas analíticas que compõem a metodologia.

Como exercício da técnica algumas amostras de azeite de oliva disponíveis no comércio de Campinas foram avaliadas quanto a sua composição em esteróis, somando-se a este parâmetro outros critérios analíticos que possibilitam a caracterização da identidade e pureza dos azeites em estudo, obedecendo as normas estabelecidas pela Resolução nº 482 / ANVISA.

Portanto, a adequação da metodologia para avaliação da composição em fitosteróis de óleos vegetais torna-se um instrumento de análise importante para os órgãos de vigilância que pretendem avaliar a legitimidade dos azeites de oliva importados de vários países com destino ao consumo interno no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Azeites de Oliva:

Foram analisadas 25 amostras de azeite de oliva adquiridas no comércio de Campinas, no período de março a maio de 2003. Destas apenas uma marca foi envasada no Brasil, as demais foram envasadas no país de origem

Os azeites foram procedentes da Argentina, Espanha, Itália e Portugal, sendo que 14 marcas apresentavam-se como azeite de oliva extra virgem, 8 como azeite de oliva e 3 como azeite de oliva puro.

Estas informações estão resumidamente dispostas nas tabelas de 1 a 3, separadas pela classificação especificada na embalagem do produto. Constam também a acidez, o país de origem, local de envase e empresa importadora e distribuidora no Brasil. Todas estas informações foram obtidas da rotulagem dos azeites analisados.

Em trabalho anterior, 4 marcas de azeite foram consideradas adulteradas com outros óleos vegetais, em função da avaliação da composição em ácidos graxos. Estes azeites não estão incluídos neste trabalho de avaliação da composição em fitosteróis, visto que o propósito de se detectar fraude já foi alcançado em etapas anteriores. No entanto, destas 4 marcas, duas foram submetidas à avaliação do percentual de beta-sitosterol, campesterol e estigmasterol, a fim de se confirmar a aplicabilidade desta metodologia na detecção de fraudes em azeites de oliva.

Tabela 1- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Extra Virgem

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAIS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
A	até 1,0%	Portugal	Origem	SS Borges
B1	—	Itália	Origem	Expand Importadora Ltda
D1	até 1%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
D2	até 1%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
E1	até 1,0%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
F1	—	Itália	Origem	Colavita Brasil Com. Imp. Exp. Ltda
H	até 0,7%	Portugal	Origem	Qualimpor, Ltda.
L1	até 0,75%	Espanha	Origem	Cargill Agrícola, S. A
M	até 1%	Espanha	Origem	La Violetera
N1	até 1%	Itália	Origem	La Violetera
N2	até 1%	Itália	Origem	La Violetera
P1	—	Argentina	Origem	Mad Product Distribuidora Ltda
R1	até 0,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
T	—	Portugal	Origem	SS Borges

(-) Dados não disponíveis na embalagem do produto.

D1 e D2, mesma marca, apresentada em 250 e 500 mL, respectivamente.

N1 e N2, mesma marca, contendo alecrim e orégano, respectivamente.

Tabela 2- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAIS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
D3	—	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
D4	até 1,5%	Espanha	Origem	Interfood Imp. Ltda
J	—	Portugal	Origem	Unilever Bestfoods Brasil Ltda
L2	até 1,0%	Espanha	Origem	Cargill Agrícola, S. A
P2	—	Argentina	Origem	Mad Product Distribuidora Ltda
Q	—	Espanha	Origem	Bunge Alimentos S.A
R2	até 1,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
S	até 1,5%	Portugal	Brasil (Vida Alimentos)	Vida Alimentos Ltda

(-) Dados não disponíveis na embalagem do produto.

D3 e D4, mesma marca, sendo D3 denominada “Suave Sabor”.

Tabela 3- Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Puro

MARCA	ACIDEZ DECLARADA	PAIS PRODUTOR	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/DISTRIBUIDOR
B2	—	Itália	Origem	Expand Importadora Ltda
E2	até 1,5%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
F2	—	Itália	Origem	Colavita Brasil Com. Imp. Exp. Ltda

(-) Dados não disponíveis na embalagem do produto.

Com base na legislação brasileira que regulamenta o setor de óleos de origem vegetal (Resolução nº 482 da ANVISA), a classificação do azeite de oliva varia em função do processo de obtenção do óleo e da acidez do azeite de oliva designado como virgem, por ser um azeite extraído por prensagem a frio do fruto da oliveira.

A classificação do azeite de oliva como “azeite extra virgem” significa dizer que o óleo foi obtido por processos mecânicos de extração e o mesmo possui acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,0 g/100g. A determinação “azeite de oliva”, por outro lado, é uma mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem, podendo ser extra, fino ou comum, sendo que a variação é influenciada pela acidez desta segunda fração (ANEXO 1).

Contudo, a determinação “azeite de oliva puro” não se encaixa na classificação em vigor no país, ficando em aberto a especificação destas marcas. Os parâmetros avaliados neste trabalho foram comparados posteriormente com a legislação para determinar se o tipo de azeite é condizente com a especificação presente no rótulo.

Reagentes:

- Padrões cromatográficos:
 - Beta-sitosterol: 60% de pureza (Sigma, S-5753);
 - Campesterol (Sigma, C-5157)
 - Estigmasterol (Fluka, 85860)
 - Dihidrocolesterol (5α -cholestan-3 β -ol; β -cholestanol): 95-97% de pureza, (Sigma, D-6128),
 - Colesterol (5-cholesten-3 β -ol): 99% de pureza, (Sigma, C-8667)
- Solução aquosa de KOH a 50 % (p/v);
- Sulfato de sódio anidro;

- Solventes orgânicos das marcas Allkimia, Synth, Vetec, EM, Merck, Quimex, Chemco, Nuclear: álcool etílico a 95%, éter de petróleo, éter etílico, hexano, clorofórmio, isopropanol;
- Solução etanólica de 2,7-diclorofluoresceína a 0,2%;
- Sílica gel 60 (Merck) para confecção de placas de vidro preparativas de 20 x 20 cm;

Equipamentos:

- Rotaevaporador;
- Sistema extrator (Butt);
- Banho termostático RM-Lauda;
- Cubas cromatográficas de vidro;
- Plataforma para confecção de placas cromatográficas (20 x 20 cm);
- Estufa com circulação de ar;
- Cabine com lâmpada ultravioleta: 365 nm ("Original Hanau" 220V, 50 Hz 85W);
- Cromatógrafo a gás da marca Agilent 6850 Series- GC System, com injetor automático acoplado a detector FID, com software Agilent Chemstation Plus, version A.08xx para integração e registro do cromatograma.

Condições cromatográficas:

- Coluna capilar de sílica fundida: LM 5 (5% fenil 95% metilpolisiloxane, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,3 µm de espessura de filme);
- Temperaturas do injetor, forno e detector de 280°C, 300°C e 300°C, respectivamente;
- Gás de arraste: Hélio; fluxo 1,1 mL/ min
- Pressão na coluna: 25,86 psi
- Velocidade média: 35 cm/ s
- Hidrogênio: 30 mL/ min

- Ar: 300 mL/ min
- Make up (N₂)= 20 mL/ min
- Split: 50:1
- Volume de injeção: 1 µL
- Tempo de corrida: 30 minutos.

2.2 Métodos

Para a determinação da composição de esteróis em azeites de oliva foi utilizada a metodologia oficial do Diário Oficial da Comunidade Européia (L 248, publicado em 05 de setembro de 1991) - Determinação da composição e conteúdo de esteróis mediante cromatografia em fase gasosa com coluna capilar. Neste trabalho o método foi adaptado, sofrendo algumas modificações, de acordo com o procedimento a seguir.

A metodologia será descrita pelo fato da fonte utilizada ser de difícil acesso.

2.2.1 Obtenção da Matéria Insaponificável.

Procedimento:

- Pesa-se 5,0 g $\pm$ 20 mg da amostra homogeneizada em um balão de fundo redondo de 250 mL;
- Adiciona-se 30 mL de álcool etílico a 95%, 5 mL de solução de KOH a 50% e 0,5 mL de padrão de dihidrocolesterol a 0,2% em isopropanol (PI);
- A saponificação acontece sob ebulição em sistema de refluxo, com aquecimento durante 1 hora após o início da condensação;
- Resfria-se o sistema adicionando, pelo condensador, 40 mL de álcool etílico a 95% e 40 mL de água destilada fria;
- Após resfriamento à temperatura ambiente, o conteúdo do balão é transferido para um funil de separação, e o balão lavado com 50 mL de éter de petróleo;

- Procede-se a extração da matéria insaponificável mediante agitação vigorosa da mistura de sabão com porções de 50 mL de éter de petróleo; após a separação da fase orgânica da aquosa, a fração de éter de petróleo é recolhida em outro funil de separação;
 - Repete-se a extração 4 vezes, utilizando-se 50mL de éter de petróleo em cada vez e agitando-se vigorosamente em cada etapa;
 - Filtra-se a fase etérea obtida das 4 extrações utilizando funil de vidro com papel de filtro e sulfato de sódio anidro, e recolhe-se o filtrado em um balão de fundo chato de 500 mL (nesta etapa foi omitida a lavagem da matéria-insaponificável para retirada do KOH);
 - Evapora-se o solvente em rotaevaporador até reduzir o volume para cerca de 5 mL;
 - Transfere-se o resíduo para um balão tipo pêra, previamente seco e tarado;
 - Evapora-se completamente o solvente e seca-se em estufa a 80°C por 30 min;
 - Após resfriamento à temperatura ambiente em dessecador, o balão é pesado para determinação da matéria insaponificável da amostra, por gravimetria.
- * A matéria insaponificável enquanto diluída no solvente apresenta aspecto de líquido ligeiramente turvo e cor amarelada.
- * As alterações adotadas nesta etapa estão detalhadas no item 3.1 de Resultados e Discussão, a seguir.

2.2.2 Separação da fração esterólica da matéria insaponificável

Inicialmente é preciso separar os componentes da matéria insaponificável por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, a qual é realizada mediante aplicação da matéria insaponificável em placas de vidro (20 x 20 cm) impregnadas com sílica gel 60 na espessura de 0,5 mm, ativadas em estufa a 105°C por 30 minutos.

Procedimento:

- Dissolve-se em 1 mL de hexano a matéria insaponificável presente no balão pêra obtida na etapa anterior;
- Com auxílio de um capilar aplica-se toda a matéria insaponificável em placa cromatográfica ativada (as placas não foram tratadas previamente com solução alcoólica de KOH a 0,2 M);
- Aplica-se nas laterais da placa uma solução padrão de esterol (colesterol a 5% em isopropanol);
- Prepara-se previamente cubas cromatográficas com hexano / éter etílico na proporção de 65:35 v/v; deixa-se saturar por 30 minutos e coloca-se as placas para eluição;
- Retira-se as placas da cuba após eluição do solvente (± 40 min); deixa-se secar em capela por 10 min;
- As placas são reveladas com pulverização de solução etanólica de 2,7-diclorofluoresceína a 0,2%;
- Sob luz ultravioleta, observa-se e delimita-se a banda dos esteróis, utilizando como referência a posição do padrão de esterol aplicado nas laterais da placa;
- Raspa-se a banda dos esteróis e procede-se a extração.

2.2.3 Extração dos esteróis:

- A sílica impregnada com a fração de esteróis é recolhida em um tubo de ensaio com tampa;
- Adiciona-se 10 mL de clorofórmio ;
- Coloca-se em banho - maria, agita-se em vortex e após a sedimentação a fase clorofórmica (sobrenadante) é recolhida;
- O líquido de extração é filtrado em papel de filtro e armazenado em balão tipo pêra;
- Lava-se o resíduo de sílica com éter etílico (± 2 mL) por 3 vezes;
- As fases etéreas são filtradas em papel de filtro e recolhidas em balão pêra;

- Evapora-se o solvente (clorofórmio + éter etílico) em rotaevaporador e/ou gás N₂;
- Dissolve-se os esteróis contidos no balão pêra com 1 mL de hexano (grau cromatográfico) e a solução está pronta para ser analisada por cromatografia em fase gasosa (a etapa de derivatização dos fitosteróis foi omitida).

* Aspecto da fração de esterol: líquido incolor em solução límpida.

* As alterações adotadas nesta etapa estão detalhadas nos itens 3.1 e 3.2 de Resultados e Discussão, a seguir.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria insaponificável e fração de esteróis em azeite de oliva:

Segundo a metodologia oficial para obtenção da matéria insaponificável é recomendado a lavagem do extrato insaponificável com água destilada para remoção do resíduo de sabão. Esta etapa não foi realizada em função da formação de emulsão e aumento da possibilidade de perdas dos analitos. Foram testadas amostras que sofreram lavagens e amostras não lavadas, observando-se que os resultados não apresentaram alterações significativas.

A metodologia para determinação de esteróis recomenda tratar as placas cromatográficas com solução alcoólica de KOH a 0,2 N. Com o uso de placas preparativas confeccionadas artesanalmente tal procedimento tornou-se impraticável em função da fragilidade da sílica impregnada. Foram testados isolamentos da fração esterólica utilizando placas industrializadas previamente tratadas com KOH e placas preparativas sem tratamento, observando-se que o tratamento melhora a resolução das bandas, porém em placas não tratadas a separação mostra-se eficiente e não gera dúvidas quanto à delimitação da banda de fitosteróis (Figura 1).

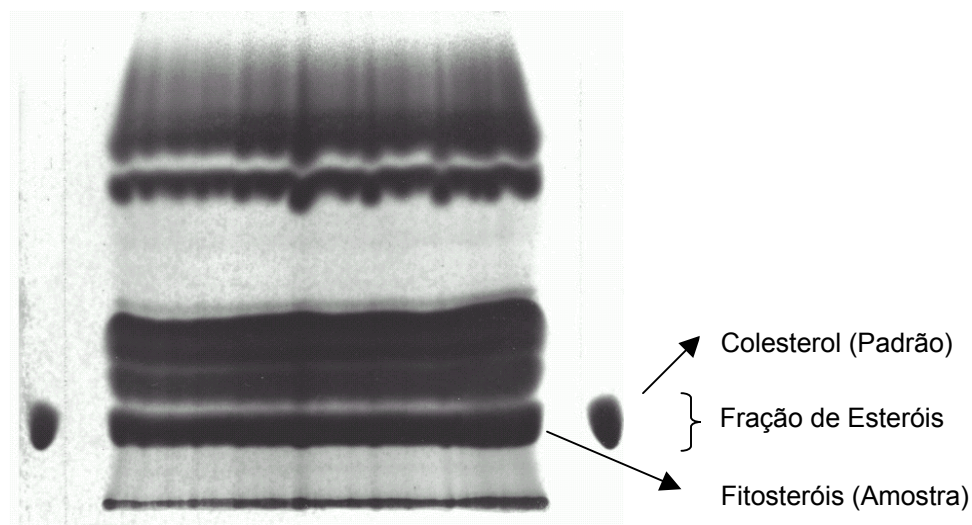


Figura 1- Cromatoplaça da matéria insaponificável de azeite de oliva revelada com solução de sulfato de cobre saturada, para efeito de ilustração das bandas dos componentes insaponificáveis, principalmente os fitosteróis, separados em placa sem tratamento com KOH.

3.2 Separação dos componentes esterólicos:

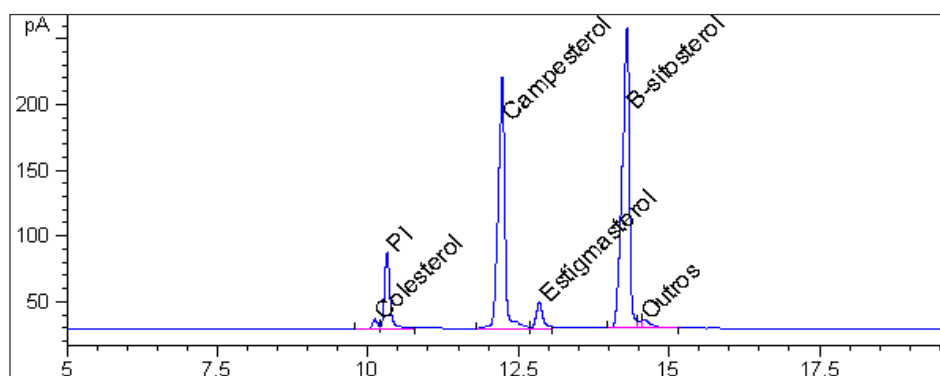
Obteve-se a fração esterólica raspando da cromatoplaça a banda correspondente aos fitosteróis, identificada mediante aplicação de solução de padrão de esterol (colesterol a 5%) nas laterais da placa, na mesma altura de aplicação da amostra.

Após a extração dos esteróis da sílica, a separação dos seus componentes foi realizada mediante cromatografia em fase gasosa em coluna capilar de sílica fundida, a qual mostrou-se eficiente na separação, promovendo boa resolução dos picos correspondentes aos diferentes fitosteróis.

Segundo a metodologia oficial, para determinação e quantificação de esteróis, após a extração da fração esterólica é necessário derivatizar os esteróis isolados, mediante reação química destes com uma mistura de piridina -

hexametildisilazano – trimetilclorosilano , 9:3:1 (v/v/v). Esta reação deve acontecer sob condições de ausência de umidade.

Foram testadas a separação por cromatografia em fase gasosa de amostras derivatizadas e sem derivatizar e os resultados encontrados não apresentaram nenhuma diferença, considerando a eficiência da coluna em proporcionar boa resolução dos componentes da mistura de esteróis (Figura 2). Portanto, a etapa de derivatização dos fitosteróis foi retirada do procedimento adotado neste trabalho.



Coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3 μ m),
em isoterma de 300°C. PI: padrão interno. Outros= sitostanol + delta 5-avenasterol +
delta 5,24-estigmastadienol

Figura 2- Cromatograma de mistura de padrões de esterol e padrão interno (PI) sem derivatização, obtido por cromatografia em fase gasosa com coluna LM-5 .

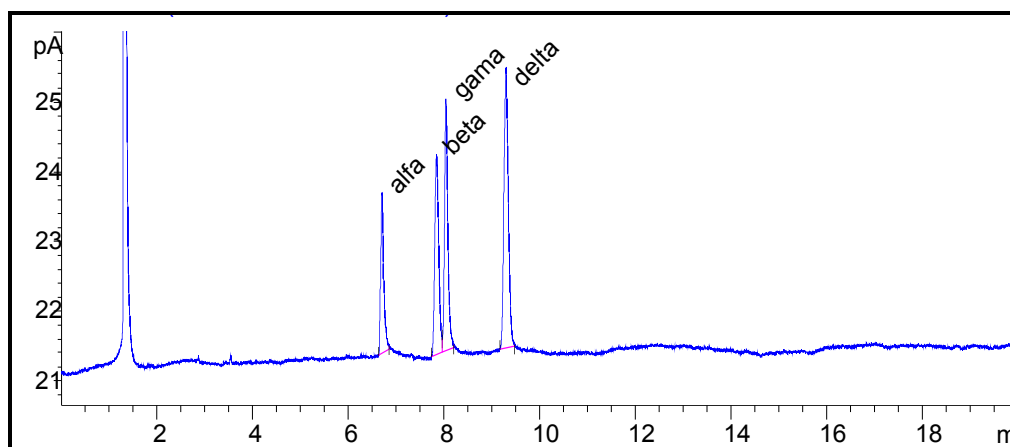
Por outro lado, existiu uma preocupação em relação à pureza da banda de esteróis e a possível interferência de compostos não esterólicos presentes nesta fração podendo interferir na separação dos compostos.

Diante disso, foi possível observar que em amostras de óleos ou gorduras vegetais com elevado teor de matéria insaponificável, alto conteúdo de ceras ou outros compostos de baixa polaridade, a separação destes na cromatoplaça

comprometeu o isolamento da banda de esteróis, e isto levou ao aparecimento de compostos não esteroidais no cromatograma da fração esterólica.

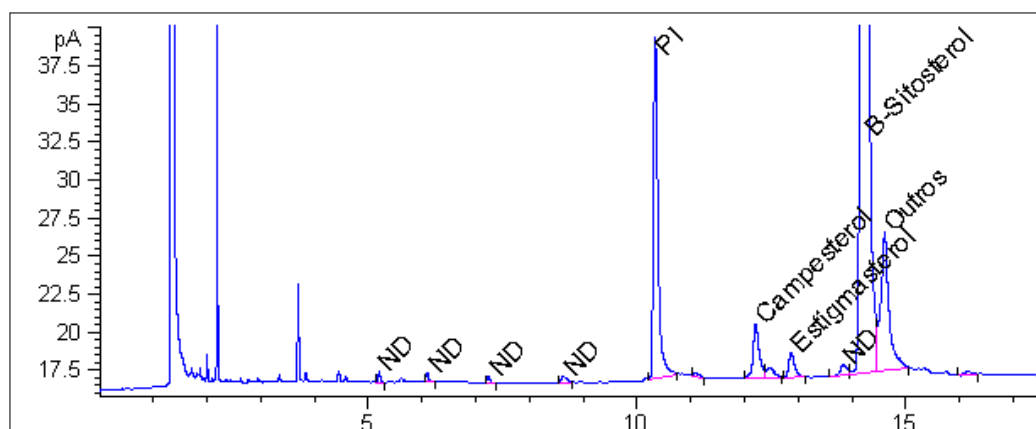
Testes complementares mostraram que, no caso de amostras de azeite de oliva com picos que antecedem o pico de padrão interno, há indicativo da presença de tocoferóis. Contudo, não há dúvidas de que a separação dos componentes esterólicos não sofre interferência de outros compostos, uma vez que o processo cromatográfico utilizado na metodologia mostrou-se eficaz na resolução dos analitos.

A Figura 3 representa um cromatograma obtido a partir da avaliação do comportamento de uma mistura de padrões de Tocoferol, analisado para certificar a não interferência destes compostos na identificação dos esteróis. A Figura 4 representa um cromatograma da fração esterólica de um azeite de oliva, que não foi isolada perfeitamente. No entanto, os compostos presentes não interferiram na determinação e quantificação dos esteróis presentes.



Coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3 μ m), em isoterma de 300°C

Figura 3- Cromatograma de uma mistura de padrões de tocoferol, determinados nas mesmas condições aplicadas à determinação dos fitosteróis em azeite de oliva.



Coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3 μ m), em isoterma de 300°C. ND: composto não determinado; P1: padrão interno; Outros: sitostanol + delta 5-avenasterol + delta 5,24-estigmastadienol

Figura 4- Cromatograma da fração esterólica de um azeite de oliva contendo tocoferóis (ND) como contaminantes da banda isolada durante a extração dos fitosteróis da matéria insaponificável.

3.3 Quantificação dos fitosteróis:

O uso de solução de padrão interno (Dihidrocolesterol) desde o início da preparação da fração insaponificável constitui-se em uma medida que garante a correção das perdas decorrentes das várias etapas da metodologia, o que possibilita também a quantificação dos componentes esterólicos.

Segundo Lognay e colaboradores (1992), para a determinação de esteróis em óleos vegetais é necessário o uso de padrão interno antes da etapa de saponificação, a uma concentração apropriada, de modo que a altura do seu pico seja proporcional ou semelhante à do composto a ser determinado.

A quantificação dos fitosteróis presentes em azeite de oliva foi realizada mediante construção de uma curva de padronização interna, na qual as concentrações do padrão de beta-sitosterol foram de 1,07, 2,14, 3,21, 4,28 e 5,35

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a concentração do padrão interno de dihidrocolesterol foi de $1,024 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foram obtidos cinco pontos injetados em triplicata e a integração da média entre as injeções foi feita pelo software Agilent Chemstation Plus, version A.08xx do cromatógrafo marca Agilent 6850 Series- GC System (Figura 5).

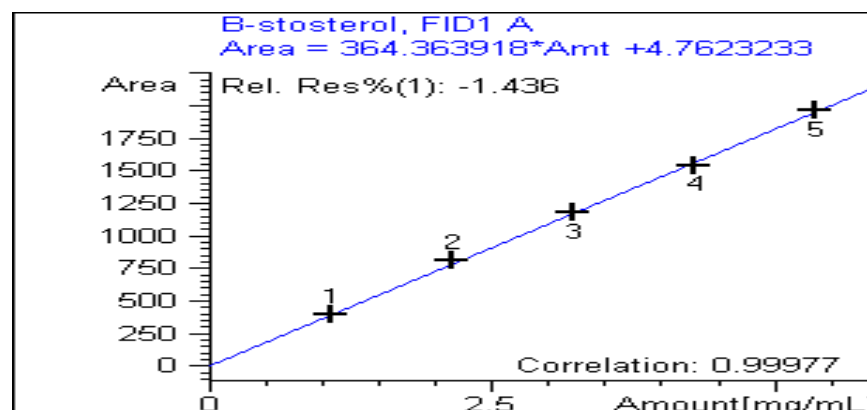


Figura 5- Curva de calibração interna utilizada para quantificação de beta-sitosterol em azeite de oliva

Pela curva obtida observou-se que existe boa correlação entre os esteróis e o padrão interno, uma vez que aumentando-se a concentração do analito e mantendo-se a concentração do padrão interno constante a linearidade foi alcançada.

A mesma relação pode ser obtida para os outros fitosteróis presentes no azeite de oliva (campesterol, estigmasterol, delta-5 avenasterol etc). O software permite calibrar todos os componentes identificados em relação à média da área do padrão interno obtido em cada injeção, fato este que permite quantificar cada componente esterólico presente na amostra de azeite.

Segundo a Resolução nº 482 que regulamenta o teor de fitosteróis no azeite de oliva, o teor individual para os fitosteróis é dado em porcentagem, ficando a quantificação em mg/kg de azeite expressa apenas para esteróis totais.

Assim, outra forma de quantificar os fitosteróis em óleos vegetais é calculando-se o percentual de cada componente, tendo como 100% a somatória das áreas de todos os picos de esteróis, ou correlacionando a área do pico do padrão interno com a somatória das áreas dos picos de esteróis, obtendo-se deste modo a quantidade de esteróis totais em mg por quilograma de óleo analisado.

Exemplo:

$$\begin{array}{ll}
 A_{PI} = 177,98692 & 177,98692 \longrightarrow 1,038 \text{ mg} \\
 A_{\text{Esteróis Totais}} = 1275,00807 & 1275,00807 \longrightarrow X \\
 [PI] = 1,038 \text{ mg/ 0,5 mL} & X = 7,4 \text{ mg de Esteróis Totais (E.T.)} \\
 & \\
 & 7,4 \text{ mg E.T.} \longrightarrow 5,0056 \text{ g de azeite} \\
 & X \longleftarrow 1000\text{g de azeite} \\
 & X = 1485,5 \text{ mg E.T./ kg de azeite}
 \end{array}$$

3.4 Aplicação da metodologia em amostras de azeite de oliva disponíveis no mercado

De acordo com o item 2.1, 25 marcas de azeite de oliva foram avaliadas quanto a sua composição em fitosteróis e a identificação dos componentes foi realizada mediante comparação com o tempo de retenção dos padrões injetados isolados ou em mistura (Figura 2).

A quantificação foi determinada pela somatória das áreas dos picos de esteróis, expressando os resultados em porcentagem de área e também correlacionando com a área do padrão interno adicionado e sua concentração em mg/mL, tendo como resultado a relação dos esteróis totais por quilograma do azeite.

O percentual dos principais fitosteróis presentes nas amostras de azeite de oliva analisadas está disposto nas Tabelas 4, 5 e 6, segundo a categoria expressa na embalagem do produto.

De acordo com a legislação em vigor (Resolução nº 482, ANVISA), ANEXO 1, para se quantificar beta-sitosterol em azeite de oliva, deve-se somar as áreas de sitosterol, sitostanol e delta 5-avenasterol, a fim de se obter um teor mínimo de 93%.

A determinação do percentual de fitosteróis em duas marcas de azeite de oliva, que já se mostravam adulteradas pela composição em ácidos graxos, foi realizada com o propósito de se confirmar a importância desta metodologia na detecção de fraudes em azeites de oliva com outros óleos vegetais. Nestas duas marcas, o teor de beta-sitosterol encontrado foi de 62% e 66%, campesterol foi de 18% e 16% e para estigmasterol, 20 % e 18%. Considerando que para beta-sitosterol o teor mínimo recomendado pela legislação é 93%, estes dados confirmam a irregularidade nas marcas que em trabalho anterior apresentaram outros parâmetros analíticos fora dos limites estabelecidos.

Tabela 4- Percentual de fitosteróis em azeites de oliva extra virgem disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)*
A	2,3	0,7	96,4
B1	2,4	0,4	93,6
D1	2,5	0,5	92,8
D2	2,2	0,7	95,0
E1	2,5	0,6	93,0
F1	2,6	0,7	95,0
H	2,7	0,6	93,0
L1	2,6	0,6	93,2
M	2,8	0,6	93,0
N1	2,3	1,0	93,0
N2	2,5	0,5	93,0
P1	4,0	1,5	<u>88,3</u>
R1	2,4	0,6	94,5
T	3,3	0,7	93,0

(*) Soma de beta-sitosterol + sitosterol + delta 5-avenasterol (ANVISA)

Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

Tabela 5- Percentual de fitosteróis em azeites de oliva refinados disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)*
D3	2,5	0,9	94,0
D4	2,3	1,0	95,2
J	2,4	1,2	95,0
L2	2,6	0,7	94,0
P2	3,7	1,0	<u>88,0</u>
Q	3,1	1,1	95,0
R2	2,6	1,5	94,0
S	3,0	1,5	95,0

(*) Soma de beta-sitosterol + sitosterol + delta 5-avenasterol (ANVISA)

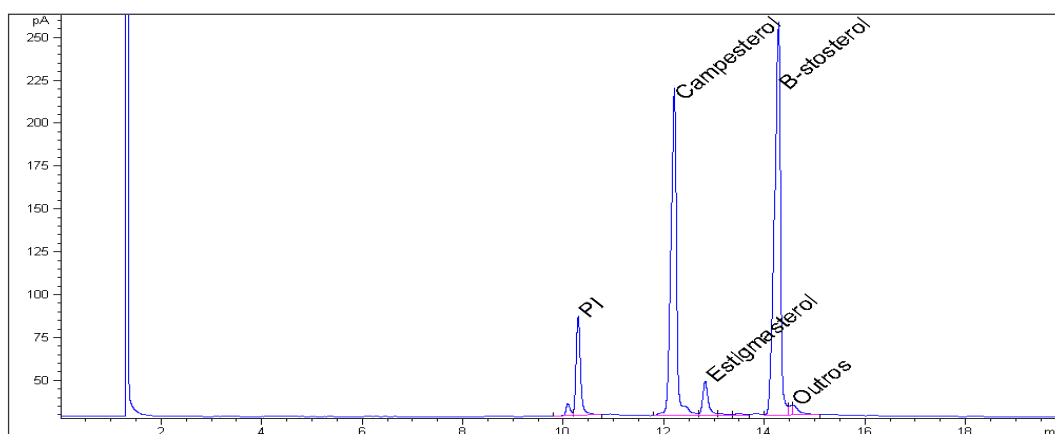
Valores sublinhados e em negrito se encontram fora dos limites recomendados.

Tabela 6- Percentual de fitosteróis em azeites de oliva puros disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)*
B2	2,4	1,1	93,8
E2	2,6	0,7	95,0
F2	2,8	0,7	94,5

(*) Soma de beta-sitosterol + sitosterol + delta 5-avenasterol (ANVISA)

Os resultados encontrados são valores médios de duplicatas de cada marca analisada por uma única injeção, apresentando um coeficiente de variação menor que 10% entre as duplicatas. Os cromatogramas obtidos apresentaram boa separação dos componentes, o que não ocasionou grandes dificuldades na identificação dos compostos mediante injeção prévia de soluções padrão (Figura 6).



Coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3 μ m), em isoterma de 300°C. PI= padrão interno; Outros= Sitosterol+ delta 5-avenasterol+ delta 5,24-estigmastadienol

Figura 6- Cromatograma da composição em fitosteróis de azeite de oliva adicionado de padrão interno.

A Resolução nº 482 da ANVISA determina que o percentual de Campesterol em azeites de oliva deve ser de no máximo 4%, o de Estigmasterol deve ser inferior ao de Campesterol e um mínimo de 93% para Beta-sitosterol e isômeros. Logo, pode-se observar que as marcas aqui avaliadas mostraram-se dentro dos limites estabelecidos, ficando abaixo dos teores recomendados apenas as marcas P1 e P2, identificadas como “Azeite de Oliva Extra Virgem e “Azeite de Oliva”, procedentes da Argentina.

Segundo Antoniassi e colaboradores (1998), a adulteração de azeite de oliva virgem pela adição de óleos de sementes pode ser identificada pelo aumento dos teores de campesterol e estigmasterol e redução do teor de beta-sitosterol.

Também foi determinada a quantidade de esteróis totais nestas 25 amostras de azeite de oliva e os resultados estão disponíveis nas Tabelas 7, 8 e 9, respeitando a classificação dos azeites mencionada nos rótulos das embalagens.

Tabela 7- Teor de esteróis totais em azeites identificados como “Azeite de Oliva Extra Virgem” disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Esteróis totais
	mg/kg
A	1576,02
B1	1778,88
D1	<u>2171,44</u>
D2	1210,61
E1	1656,15
F1	1388,18
H	1679,64
L1	1702,22
M	1527,07
N1	1726,76
N2	<u>1946,59</u>
P1	<u>2186,87</u>
R1	1620,58
T	1462,19

* Valores sublinhados e em negrito estão acima dos limites recomendados

Tabela 8- Teor de esteróis totais em azeites identificados como “Azeite de Oliva” disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Esteróis totais
	mg/kg
D3	1619,39
D4	1512,27
J	1441,82
L2	1515,97
P2	<u>2291,58</u>
Q	1434,45
R2	1293,30
S	1693,89

* Valores sublinhados e em negrito estão acima dos limites recomendados

Tabela 9- Teor de esteróis totais em azeites identificados como “Azeite de Oliva Puro” disponíveis no comércio de Campinas.

AMOSTRAS	Esteróis totais
	mg/kg
B2	1540,85
E2	1535,33
F2	1572,44

Segundo a legislação brasileira que regulamenta os limites para esteróis totais em azeites de oliva, o limite mínimo para todas as categorias de azeite é de 1000 mg/ kg (ANEXO 1), ficando fora desta regra apenas os óleos obtidos por extração com solvente do bagaço e/ou caroço da azeitona que devem possuir um teor mínimo de 1800 mg/ kg

Com base neste limite estabelecido pela Resolução nº 482, os azeites das marcas D1, N2, P1 e P2 apresentaram teores bastante elevados para esteróis totais, indicando fraude por adição de óleo de bagaço de oliva. Por outro lado, os azeites P1 e P2 já foram considerados adulterados com outro óleo vegetal por apresentar teor de beta-sitosterol abaixo do recomendado para azeite de oliva legítimo.

Trabalhos de quantificação de compostos minoritários realizados no exterior (dados não publicados) a pedido da Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de azeite de Oliveira (OLIVA), culminaram na divulgação de relatórios sobre qualidade de azeites de oliva no mês de março de 2003. Tal boletim de divulgação incluiu as marcas D, J, A, E e Q como regulares, e as marcas C, G, I e O como irregulares (ANEXO 2). Esta iniciativa da Associação teve por objetivo avaliar a genuinidade dos azeites distribuídos no Brasil com o intuito de iniciar ações para regularizar a situação de confiança aos importadores. Nossos resultados corroboram com os divulgados neste boletim.

4 CONCLUSÕES

A adequação da metodologia para determinação e quantificação de fitosteróis em azeite de oliva foi realizada obedecendo as principais etapas estabelecidas na metodologia oficial, contudo algumas etapas como lavagem da matéria insaponificável com água, tratamento das placas preparativas com solução alcalina e derivatização da fração esterólica foram suprimidas, sem que alterações significativas fossem observadas no resultado final de identificação e quantificação dos fitosteróis.

A condição cromatográfica estabelecida para determinação de fitosteróis e o uso de coluna capilar de sílica fundida de polaridade média (LM-5 - 5% fenil 95% metil polisiloxano, 30m x 0,25mm x 0,3 μ m), mostraram-se eficientes, pois obteve-se ótima resolução dos picos dos componentes esterólicos. Além disso, a adoção de dihidrocolesterol como padrão interno desempenha um papel importante para se calcular o teor de fitosteróis nos óleos vegetais. Sem esta técnica a quantificação dos analitos estaria comprometida, uma vez que a metodologia é constituída de várias etapas que favorecem perdas significativas dos fitosteróis até a sua determinação final.

A aplicação da metodologia de quantificação de fitosteróis na avaliação de amostras de azeite de oliva disponíveis no comércio de Campinas mostrou ser um bom exercício da técnica, uma vez que associada a outras metodologias de caracterização das amostras, avaliadas em capítulos anteriores, foi possível detectar adulteração em quatro azeites (D1, N2, P1 e P2), das 25 marcas avaliadas.

A aplicação desta técnica na avaliação da qualidade e legitimidade dos azeites comercializados no país é um instrumento de interesse para os órgãos de vigilância, tendo em vista que todo o azeite consumido no Brasil é importado da

Europa ou Argentina, por se tratar de um produto caro, bastante apreciado pelo brasileiro e por não existir até o momento órgãos competentes que apliquem esta metodologia como rotina de trabalho. Desta forma, torna-se comum a adulteração do azeite de oliva com outros óleos vegetais, ou com azeite de oliva de qualidade inferior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 935, p. 173-201, 2001.

AMELIO, M.; RIZZO, R.; VARAZINI, F. Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high- performance liquid chromatographic and high- resolution gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 606, p. 179- 185, 1992.

ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; JUÁREZ, M. Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 131-135, 1997.

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D. A.; SZPIZ, R. R.; JABLONKA, F. H.; LAGO, R. C. A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 1, n. 1, 2, p. 32-43, jan/ dez,1998.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, Brasília, nº 3029, publicada em 20/06/2000.

AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY) **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign, 2002.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação do grau discriminatório de parâmetros analíticos do azeite de oliva: 1. Aplicação da espectrofotometria derivada.**

1991. 223 p. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

CERCACI, L.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; LERCKER, G. Solid-phase extraction- thin- layer chromatography - gas chromatography method for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 985, p. 211- 220, 2003.

CERT, A. Normativa International sobre el aceites de oliva y otras grasas vegetales- posible utilidad de nuevos métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, p. 175-189, jun., 1995.

CERT, A.; MOREDA, W.; GARCÍA-MORENO, J. Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. **Grasas Y Aceites**, Sevilla, v. 48, n. 4, p. 207- 218, 1997.

DUTTA, P. C.; NORMÉN, L. Capillary column gas-liquid chromatographic separation of Δ^5 - unsaturated and saturated phytosterols. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 816, p. 177- 184, 1998.

LOGNAY, G.; SEVERIN, M.; BOENKE, A.; WAGSTAFFE, P. J. Edible fats and oils reference materials for sterols anlysis with particular attention to cholesterol. Part 1- Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. **Analyst**, London, v. 117, p. 1093- 1097, 1992.

MARIANI, C.; VENTURINI, S. Individuazione dell'olio di girasole ad alto oleico desterolato nell'olio di oliva II. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 74, n. 11, p. 489-50, nov, 1997.

NTANIOS, F. Plant sterol-ester-enriched spreads as an example of a new functional food. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, p. 102-106, 2001.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 444- 452, out/dez, 1998.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 123- 142, 2002.

TOIVO, J.; PIIRONEN, V.; KALO, P.; VARO, P. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid- phase extraction in sample preparation. **Chromatographia**, v. 48, n. 11/12, p. 745- 750, 1998.

TRUJILLO-QUIJANO, J. A.; COSTA, P. Critérios de pureza em azeites de oliva. **Óleos & Grãos**. São Caetano do Sul, ano V, p. 17-24, jan/fev, 1995.

VERLEYEN, T.; FORCADES, M.; VERHE, R.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A.; GREYT, W. Analysis of free and esterified sterols in

vegetable oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.79, n. 2, p. 117- 122, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

1- No estudo da adequação da metodologia de determinação da composição e conteúdo de fitosteróis em azeite de oliva, chegou-se às seguintes conclusões:

- A etapa de extração da matéria insaponificável dispensa as lavagens com água. A subtração desta etapa evita a formação de emulsão durante a extração e diminui o risco de perdas do analito;
- A utilização de cromatografia em camada delgada preparativa com placas não tratadas com solução alcoólica de KOH não compromete a separação dos componentes insaponificáveis;
- A quantificação confiável dos fitosteróis é atribuída ao uso de diidrocolesterol como padrão interno, pois este elui com a fração dos esteróis na separação da matéria insaponificável, sem interferir na separação dos fitosteróis por cromatografia em fase gasosa, corrigindo desta forma as possíveis perdas do analito durante as várias etapas da metodologia;
- A presença de compostos estranhos ou não esterólicos (por exemplo os tocoferóis) provenientes de uma má separação da banda de esteróis extraída da cromatoplaca não interfere na identificação dos fitosteróis.

2- Avaliação da identidade e qualidade de azeites de oliva disponíveis no comércio de Campinas:

- A avaliação prévia dos azeites de oliva por metodologias rotineiras é uma conduta segura para se triar as amostras através da sua caracterização físico-química, obedecendo os limites estabelecidos pela norma vigente no Brasil, que regulamenta o setor de óleos. Esta etapa utiliza tecnologias mais simples, permitindo a detecção de fraudes grosseiras em azeite de oliva com adição de óleos de sementes, ou do próprio azeite de oliva refinado ou de qualidade

inferior. Nesta etapa do trabalho, observou-se irregularidades evidentes nas seguintes marcas de azeite de oliva : B1,C, F1, G, I, N1, N2, O, P1, P2 e R1;

- A avaliação da composição em fitosteróis permitiu detectar adulteração nos azeites D1, N2, P1 e P2. Esta metodologia mostrou-se sensível o suficiente para detectar fraude em azeites que se mostravam regulares perante técnicas analíticas rotineiras;
- A associação de técnicas analíticas seqüenciais e de complexidade crescente continua sendo a melhor maneira de se concluir uma investigação de adulteração em azeite de oliva;
- Através das determinações de identidade (perfil de ácidos graxos e composição em esteróis) e de qualidade (acidez, absorvidade no ultravioleta) realizadas neste trabalho em 29 marcas de azeites, 12 foram enquadradas como irregulares (41,4%), nível preocupante para o consumidor e importador.

ANEXOS

ANEXO 1

RESOLUÇÃO Nº 482, DE 23 DE SETEMBRO DE 1999.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o item III do art.72 do Regimento Interno Aprovado pela Resolução nº 1, de 26 de abril de 1999, em reunião realizada em 22 de setembro de 1999, e considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e da necessidade de fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devam obedecer os ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS, **resolve**:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico referente a ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS, constante do anexo desta Resolução.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 180 (cento e oitenta) dias, a contar da data da publicação deste Regulamento, para se adequarem ao mesmo.

Art. 3º O descumprimento desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades da Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação, revogando as disposições em contrário, em especial, os itens referentes a Óleos e Gorduras Vegetais da Resolução CNNPA nº 22/77, Resolução Normativa CTA no 25/79 e Portaria SNVS no 062/91.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS

1. ALCANCE

1.1. Objetivo:

Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devam obedecer os óleos e gorduras vegetais.

1.2. Âmbito de Aplicação

Aplica-se aos óleos e gorduras vegetais, descritos nos anexos 1 a 17, sendo o anexo 13 referente ao azeite de oliva.

ANEXO 13

AZEITE DE OLIVA

1. DESCRIÇÃO

1.1. Definição: Azeite de oliva é o óleo comestível obtido diretamente do fruto da Olea europaea L. (oliveira) através de processos tecnológicos adequados.

1.2. Classificação:

1.2.1. Quanto ao processo:

1.2.1.1. Azeite virgem de oliva: azeite obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, particularmente condições térmicas, que não levem a deterioração do azeite, e que não seja submetido a outro tratamento que não a lavagem, decantação, centrifugação e filtragem. Excluem-se os óleos obtidos por meio de solvente ou re-esterificação e misturas com óleos de outra natureza.

1.2.1.2. Azeite de oliva refinado: azeite de oliva obtido pelo refino do Azeite virgem de oliva, com acidez final, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5% (g/100g).

1.2.1.3. Azeite de oliva: azeite de oliva constituído pela mistura de Azeite de oliva refinado com Azeite virgem de oliva extra, fino ou comum. Não poderá ser misturado com o Azeite virgem de oliva lampante. O produto deverá ter acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,5% (g/100g).

1.2.1.4. Óleo de bagaço e/ou caroço de oliva refinado: óleo refinado obtido do bagaço e/ou caroço de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5% (g/100g).

1.2.2. Quanto a acidez do Azeite virgem de oliva:

1.2.2.1. Azeite virgem de oliva extra: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,0% (g/100g).

1.2.2.2. Azeite virgem de oliva fino: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 2,0% (g/100g).

1.2.2.3. Azeite virgem de oliva comum ou semi-fino ou corrente: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 3,3% (g/100g). O azeite virgem comum não pode ser pré embalado quando destinado diretamente para a venda ao consumidor final. O produto pode ser misturado com Azeite Refinado de Oliva para constituir o tipo comercial designado somente como Azeite de Oliva (item 1.2.1.3.).

1.2.2.4. Azeite virgem de oliva lampante: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, superior a 3,3% (g/100g). O azeite virgem de oliva lampante não pode ser pré embalado quando destinado diretamente ao consumidor final. É, obrigatoriamente, destinado ao refino, não podendo ser usado

para constituir mistura com azeite refinado. O produto pode ser destinado para usos que não sejam diretamente os do gênero alimentício, nem diretamente de ingrediente de gênero alimentício.

1.3. Designação

O produto deve ser designado de acordo com a sua classificação, item 1.2. O termo Oliva pode ser substituído opcionalmente pelo termo Oliveira.

2. COMPOSIÇÃO E REQUISITOS

2.1. Composição

. Ingrediente Obrigatório: azeite de oliva ou óleo de bagaço e/ou caroço de oliva.

2.2. Requisitos

2.2.1. Características Sensoriais:

2.2.1.1. Aspecto: líquido límpido a 25°C.

2.2.1.2. Cor: característica.

2.2.1.3. Odor: característico.

2.2.1.4. Sabor: característico.

2.2.2. Características Físicas, Químicas e Físico-Químicas:

Produto	Densidade relativa (20°C/20°C)	Densidade relativa (25°C/25°C)	Índice de refração (n _D ²⁰)	Índice de saponificação	Índice de iodo (Wijs)	Matéria insaponificável (g/100g)	Acidez em ácido oléico (g/100g)	Índice de peróxido meq O ₂ /kg	Solventes halogenados mg/kg ⁽¹⁾	Ceras, mg/kg
Azeite virgem extra	0,910 - 0,916	0,907 - 0,913	1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	M 1,0	M 20	M 0,20	M 250
Azeite virgem	0,910 - 0,916	0,907 - 0,913	1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	M 2,0	M 20	M 0,20	M 250
Azeite virgem comum	0,910 - 0,916	0,907 - 0,913	1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	M 3,3	M 20	M 0,20	M 250
Azeite refinado	0,910 - 0,916		1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	M 0,5	M 5	M 0,20	M 350
Azeite	0,910 - 0,916		1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350
Azeite virgem lampante	0,910 - 0,916		1,4677 - 1,4705	184 - 196	75-94	1,5	m 3,3	m 20	m 0,20	M 350
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	0,910 - 0,916		1,4680 - 1,4707	182 - 193	75-92	3,0	M 0,5	M 5	M 0,20	> 350

M=máximo; m=mínimo

(1) Limite máximo total para compostos halogenados detectado com um detector de captura de elétrons.

Para compostos detectados individualmente, o limite é de 0,10mg/kg.

Composição em ácidos graxos

Ácido graxo	Nomenclatura	% (g/100g)
C 14:0	Mirístico	< 0,05
C 16:0	Palmítico	7,5 - 20,0
C 16:1	Palmitoléico	0,3 - 3,5
C 17:0	Margárico	< 0,3
C 17:1	Heptadecenóico	< 0,3
C 18:0	Estearico	0,5 - 5,0
C 18:1	Oléico	55,0 - 83,0
C 18:2	Linoléico	3,5 - 21,0
C 18:3	Linolênico	< 0,9
C 20:0	Araquídico	< 0,6
C 20:1	Eicosenóico	< 0,4
C 22:0	Behênico	< 0,3
C 24:0	Lignocérico	< 0,2

Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva

Produto	Soma dos isômeros trans oléicos (%)	Soma dos isômeros trans Linolêicos + translinolênicos (%)	Colesterol (% no total de esteróis)	Brassicasterol (% no total de esteróis)	Campesterol (% no total de esteróis)	Estigmasterol (% no total de esteróis)	Beta sitosterol (% no total de esteróis) ⁽¹⁾	Delta-7-estigmasterol (% no total de esteróis)	Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (% no total de esteróis)
Azeite virgem extra	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite virgem comum	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite comum	M 0,05	M 0,05	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite refinado	M 0,20	M 0,30	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite	M 0,20	M 0,30	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Azeite virgem lampante	M 0,10	M 0,10	M 0,5	M 0,1	M 4,0	-	m 93	M 0,5	m 1000	M 4,5
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	M 0,40	M 0,35	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Campesterol	m 93	M 0,5	m 1800	m 12

M= máximo; m= mínimo

(1) $\Delta 5,23$ - Estigmastadienol+ Clerosterol+ Sitosterol+ Sitostanol+ $\Delta 5$ -avenasterol+ $\Delta 5,24$ -Estigmastadienol

Valores limites de alguns parâmetros de pureza para azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva

Produto	Ácidos graxos na posição 2 dos triglicerídios (%)	Estigmastadienos (mg/kg) ⁽¹⁾	Diferença NCE42 ⁽²⁾	Trilinoleína (%)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₇₀ com alumina ⁽³⁾	Delta K
Azeite virgem extra	M 1,3	M 0,15	M 0,2	M 0,5	M 2,50	M 0,20	M 0,10	M 0,01
Azeite virgem	M 1,3	M 0,15	M 0,2	M 0,5	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Azeite virgem comum	M 1,3	M 0,15	M 0,3	M 0,5	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01
Azeite refinado	M 1,5	-	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	-	M 0,16
Azeite	M 1,5	-	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	-	M 0,13
Azeite virgem lampante	M 1,3	M 0,50	M 0,3	M 0,5	M 3,70	m 0,25	M 0,11	-
Óleo de bagaço e/ou caroço refinado	M 2,0	-	M 0,5	M 0,6	M 5,50	M 2,50	-	M 0,25

M= máximo; m= mínimo

(1) Soma dos isômeros que podem (ou não) ser separados em coluna capilar.

(2) Diferença entre o NCE42 determinado por HPLC e o NCDE42 obtido por cálculo teórico.

(3) Para verificar a presença de óleos refinados, quando K₂₇₀ exceder o limite da categoria correspondente deve proceder a determinação de K₂₇₀ após passagem por coluna de alumina.

3. CONTAMINANTES

3.1. Matéria volátil a 105oC, g/100g	
. azeite de oliva virgem.....	Máximo 0,2%
. azeite de oliva.....	Máximo 0,15%
. azeite de oliva refinado.....	Máximo 0,10%
. óleo de bagaço refinado e/ou caroço de oliva.....	Máximo 0,10%
3.2. Impurezas insolúveis, g/100g	
. azeite de oliva virgem.....	Máximo 0,10%
. azeite de oliva.....	Máximo 0,07%
. azeite de oliva refinado.....	Máximo 0,05%
. óleo de bagaço refinado e/ou caroço de oliva.....	Máximo 0,05%
3.3. Sabão, g de oleato de sódio/100g	
. azeite de oliva refinado.....	Negativo
. óleo de bagaço refinado.....	Negativo

4. ROTULAGEM

Deve obedecer à legislação específica e, ainda, declarar o teor de acidez do produto.

ANEXO 2

Boletim Informativo

Ano 2 – Número 03

Março / 03

OLIVA

Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliveira.

PROGRAMA DE CONTROLE DE QUALIDADE - PCQ

Por ocasião da edição do Boletim Informativo anterior, encontravam-se em fase de análise nos laboratórios nacionais algumas amostras de azeites cujos resultados são:

Marca	Embalagem	ml.	Fabricante/Importador	Lote	Resultado
Carbonell	Lata	500	Interfood	4374121806A	regular
Fígaro	Lata	500	Mitsui Alimentos	4333021902B	regular
Gallo	Lata	500	Unilever	98 B/2	regular
La Pastina	Lata	500	La Pastina	JHB	regular
Triunfo	Lata	500	Casa Flora Ltda.	03/jan	regular

AMOSTRAS ENVIADAS AO COI – CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL

Faz parte do Programa de Controle de Qualidade – PCQ o envio ao COI – Conselho Oleícola Internacional, com sede em Madrid – Espanha, de um exemplar das amostras de azeites coletadas e analisadas nos laboratórios brasileiros para serem analisadas, também, por laboratório no exterior credenciado pelo COI.

Já foram enviadas ao COI, até o momento, 52 amostras de azeites analisadas no Brasil. Dessas 52 amostras já foi recebido o resultado de 17 amostras. Como é possível verificar abaixo, os resultados do COI confirmaram como REGULARES as marcas: Andorinha, Mercadorama e Salada. O COI, através de análises mais completas (*), revisou os resultados obtidos nos laboratórios brasileiros para as marcas: Carrefour, Setúbal e Vale Fértil, considerando-as IRREGULARES. Já as demais marcas: Astorga, Buono, Dolagar, Faisão, Figueira da Foz, Macareña, Mediterrâneo, Minha Quinta, Molinos, Quinta da Boa Vista e Requite tiveram os resultados dos laboratórios locais confirmados, todas IRREGULARES.

Comparativo dos Resultados:

Marca	Embalagem	ml.	Fabricante/ Importador	Lote	Resultado / COI	Resultado/ Brasil
Andorinha	Lata	500	Simão & Cia.	92/01	regular	regular
Astorga	Lata	500	SS Borges	155M/98	irregular	irregular
Buono	Vidro	500	Mediterrâneo	99-382/A	irregular	irregular
Carrefour	Lata	500	Carrefour	630	irregular	regular
Dolagar	Lata	500	Paladar	120/2001	irregular	irregular
Faisão	Lata	500	Olima Alimentos	152	irregular	irregular
Figueira da Foz	Lata	500	Paladar	100/2001	irregular	irregular
Macareña	Lata	500	SS Borges	155M/98	irregular	irregular
Mediterrâneo	Vidro	500	Mediterrâneo	06-M	irregular	irregular
Mercadorama	Lata	500	Sonae	02/fev	regular	regular
Minha Quinta	Lata	500	SS Borges	155M/98	irregular	irregular
Molinos	Lata	500	SS Borges	155M/98	irregular	irregular
Quinta da Boa Vista	Lata	500	Olima Alimentos	1	irregular	irregular
Requinte	Lata	500	Olima Alimentos	152	irregular	irregular
Salada	Lata	500	Bunge Alimentos	01/jul	regular	regular
Setúbal	Lata	500	Ad.Exp.L.F.	13	irregular	regular
Vale Fértil	Lata	500	CastroVale Fértil	17/06/2002	irregular	regular

(*) Observação: considerar que os laboratórios nacionais não realizam, ainda, análises com o mesmo nível de profundidade dos laboratórios no exterior credenciados pelo COI. O Comitê Técnico da Associação está trabalhando junto aos laboratórios locais, principalmente a EMBRAPA, para que as análises aqui no Brasil possam ser realizadas dentro da mesma metodologia e no mesmo nível de profundidade e abrangência dos laboratórios da Europa.

NOVAS COLETAS

Estão em análise nos laboratórios nacionais amostras de novos lotes de azeites de marcas já analisadas anteriormente, que são:

Marca	Embalagem	ml.	Fabricante/Importador	Lote
Astorga	Lata	500	SS Borges	658B/03
Mediterrâneo	Vidro	500	Mediterrâneo	15M
Minha quinta	Lata	500	SS Borges	750B?03
Otoyan	Lata	500	Mad. Products	E576
Quinta dos Olivais	Lata	500	Aceites Del Sur	09B
Requinte	Lata	500	Olima	158

ASSEMBLÉIA GERAL

Será realizada no próximo mês de junho a Assembléia Geral que elegerá a Diretoria e o Conselho Fiscal que comandarão os destinos da Associação no biênio de 2.003/2.005. Todos os associados serão convocados, oportunamente, na forma regimental.

NOVOS ASSOCIADOS

Fica renovado o convite a todos os associados para que enviem todos os esforços no sentido de trazer para a Associação novas empresas, nacionais ou estrangeiras, ligadas à comercialização do azeite de oliva.

CONTATOS COM A ASSOCIAÇÃO

Contatos poderão ser feitos através de qualquer membro da Diretoria ou diretamente no escritório administrativo da Associação:

Av. Senador Queiroz, 605, 9.o andar, conj. 904

CEP 01026-001 - São Paulo - Capital

Fone (011) 3313.6490

e-mail: azeite@oliva.org.br

com Sra. Cinthia.

Missão da OLIVA:

LUTAR PELA DEFESA DO BOM AZEITE NO BRASIL.