



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



**QUANTIFICAÇÃO DE ESTIGMASTADIENOS EM AZEITE DE OLIVA
(*Olea europaea L.*) POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA**

Juliana Stefanon Modolo

(Engenheira de Alimentos)

ORIENTADORA: Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

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

CAMPINAS – SP – BRASIL

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M721.g Modolo, Juliana Stefanon
Quantificação de estigmastadienos em azeite de oliva (*Olea europaea* L.) por cromatografia em fase gasosa / Juliana Stefanon Modolo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

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

0315.031

Titulo em inglês: Stigmastadiene quantification in olive oil (*Olea europaea* L.) by gas chromatography

Palavras-chave em inglês (Keywords): Olive oil, 3,5-stigmastadiene, Adulterations, Gas chromatography

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Heloísa Mascia Cecchi

Renata Maria dos Santos Celeghini

Thaís Maria Ferreira de Souza Vieira

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

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

**Professora Dra. Heloísa Mascia Cecchi
(Membro)**

**Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
(Membro)**

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

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Gerson e Maria do Carmo, pela sua inesgotável compreensão, incentivo, amor e carinho, e por serem responsáveis pela formação do meu caráter.

Ao meu amor, Alexandre, pelo incentivo durante esta trajetória e, sobretudo, pelo companheirismo, carinho, amor, amizade e compreensão.

E a todos os meus familiares que me apoiaram ao longo destes anos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a realização deste sonho e por estar sempre ao meu lado, me dando sabedoria para tomar as decisões certas nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, professora Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves, pela oportunidade concedida, confiança, paciência e pela atenção dedicada durante toda a realização deste trabalho.

Ao Dr. Arturo Cert, do Instituto de la Grasa, Sevilla – Espanha, especialista em análise de estigmastadieno e que foi fundamental no esclarecimento de várias dúvidas que surgiram ao longo desta dissertação.

À Dra. Sabria Aued-Pimentel, do Instituto Adolfo Lutz, por sua imensa colaboração, mostrando-se sempre disponível a ajudar no decorrer das análises de determinação de ECN42.

Ao Dr. Renato Grimaldi, pela profunda e indispensável colaboração prestada, e por enriquecer os meus conhecimentos técnico-científicos.

À Rosana N. C. Moreira, por estar disponível a me ajudar em vários momentos.

À amiga Denise F. S. Becker de Almeida, por me ajudar em tantos momentos, deixando até mesmo seus afazeres, mas principalmente, pela sua amizade, apoio e companheirismo.

À pesquisadora científica, Dra. Maria Eugenia Marques de Almeida, do Instituto de Tecnologia de Alimentos e ao ex-professor da Universidade Metodista

de Piracicaba, Izael Gressoni Júnior, por terem me incentivado a ingressar neste curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Rodrigo Nagem Bellotto, ex-aluno de iniciação científica, que se dispôs a ajudar no início da execução do projeto.

À profa. Dra. Heloísa M. Cecchi, à Dra. Renata M. S. Celeghini e à Dra. Thaís M. F. S. Vieira, por aceitarem participar da banca examinadora, podendo assim colaborar com seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Óleos e Gorduras, pelo companheirismo e por terem me proporcionado recordações memoráveis.

Aos professores, funcionários e alunos da UNICAMP que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação.

À minha família, que esteve sempre do meu lado, me apoiando incondicionalmente em todas as minhas decisões.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE QUADROS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Origem e Difusão da Oliveira.....	5
2.1.1. Características Gerais e Climatológicas da Oliveira.....	5
2.1.2. Variedades de Olivas.....	7
2.1.3. Cultivo da Oliveira no Brasil.....	8
2.1.4. Processamento das Olivas.....	10
2.2. Dados Estatísticos do Azeite de Oliva.....	11
2.2.1. Produção de Azeite de Oliva.....	11
2.2.2. Consumo de Azeite de Oliva.....	13
2.2.3. Exportação de Azeite de Oliva.....	15
2.2.4. Importação de Azeite de Oliva.....	17
2.3. Composição do Azeite de Oliva.....	18
2.3.1. Componentes Glicerídicos.....	19
2.3.2. Componentes não Glicerídicos.....	22

2.3.3. Azeite de Oliva e Saúde.....	26
2.4. Legislação do Azeite de Oliva.....	28
2.4.1. Classificação do Azeite de Oliva.....	29
2.4.2. Características de Identidade do Azeite de Oliva.....	31
2.5. Adulteração do Azeite de Oliva.....	32
2.5.1. Técnicas Analíticas para Detectar Fraudes.....	34
2.5.2. Formação de Estigmastadienos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Material.....	43
3.1.1. Matérias Primas.....	43
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Critérios de Qualidade.....	45
3.2.1.1. Análises Físico-Químicas.....	46
3.2.1.2. Determinação do Coeficiente de Extinção Específica.....	46
3.2.2. Critérios de Pureza.....	53
3.2.2.1. Composição em Ácidos Graxos.....	53
3.2.2.2. Índice de Iodo e Saponificação Calculados.....	54
3.2.2.3. Determinação da Diferença do ECN 42 Experimental e Teórico...	54
3.2.2.4. Quantificação de Estigmastadienos.....	56
a) Obtenção da Matéria Insaponificável.....	57
b) Separação da Fração de Hidrocarbonetos Esteróides.....	61
c) Cromatografia em Fase Gasosa.....	65
d) Identificação de Picos no Cromatograma.....	65

e) Análise Quantitativa.....	66
3.2.2.5. Quantificação de Esteróis.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1. Critérios de Qualidade.....	71
4.1.1. Análises Físico-Químicas.....	71
4.1.2. Coeficiente de Extinção Específica.....	74
4.1.2.1. Estudos Preliminares.....	74
4.1.2.2. Procedimento Experimental.....	75
4.2. Critérios de Pureza.....	81
4.2.1. Composição em Ácidos Graxos.....	81
4.2.2. Índice de Iodo e Saponificação Calculados.....	90
4.2.3. Determinação da Diferença do ECN 42 Experimental e Teórico.....	92
4.2.3.1. Estudos Preliminares.....	92
4.2.3.2. Procedimento Experimental.....	96
4.2.4. Quantificação de Estigmastadienos.....	106
4.2.4.1. Estudos Preliminares.....	106
4.2.4.2. Procedimento Experimental.....	115
4.2.5. Quantificação de Esteróis.....	123
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
6. CONCLUSÕES.....	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXO 1.....	153

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de azeite de oliva.....	12
Tabela 2. Produção de azeite de oliva na União Européia.....	13
Tabela 3. Consumo mundial de azeite de oliva na década de 90.....	14
Tabela 4. Consumo mundial de azeite de oliva a partir do ano 2000.....	14
Tabela 5. Consumo de azeite de oliva na União Européia.....	15
Tabela 6. Maiores exportadores de azeite de oliva no mundo.....	16
Tabela 7. Exportação do azeite de oliva pela União Européia.....	16
Tabela 8. Maiores exportadores de azeite de oliva para o Brasil.....	17
Tabela 9. Maiores importadores de azeite de oliva no mundo.....	18
Tabela 10. Importação do azeite de oliva pela União Européia.....	18
Tabela 11. Composição em ácidos graxos do azeite de oliva virgem.....	21
Tabela 12. Características físico-químicas dos azeites de oliva.....	30
Tabela 13. Limites estabelecidos para alguns critérios de qualidade e pureza de azeites de oliva.....	32
Tabela 14. Dados retirados dos rótulos de azeites de oliva extra virgem.....	44
Tabela 15. Dados retirados dos rótulos de azeites de oliva virgem.....	44
Tabela 16. Limites máximos permitidos para os critérios de qualidade.....	45
Tabela 17. Limites máximos permitidos para a análise de Δ ECN42.....	56
Tabela 18. Limites máximos permitidos para a análise de estigmastadieno.....	66
Tabela 19. Limites permitidos por Legislação para a análise de esteróis.....	68
Tabela 20. Critérios de qualidade para os azeites de oliva extra virgem e virgem.....	72
Tabela 21. Critérios de qualidade para os azeites de oliva extra virgem e virgem.....	76

Tabela 22. Composição em ácidos graxos dos azeites de oliva extra virgem e virgem.....	84
Tabela 23. Composição em ácidos graxos do óleo de girassol, do azeite de oliva extra virgem e da amostra E.....	85
Tabela 24. Composição em ácidos graxos dos óleos de soja e de canola, do azeite de oliva extra virgem e da amostra B.....	86
Tabela 25. Teor de isômeros <i>trans</i> dos azeites de oliva extra virgem e virgem.....	89
Tabela 26. Índices de iodo e saponificação dos azeites de oliva extra virgem e virgem.....	91
Tabela 27. Composição triacilglicerólica do óleo de soja.....	93
Tabela 28. Composição triacilglicerólica por HPLC das três amostras analisadas.....	95
Tabela 29. Valores de diferença de ECN42 para azeites de oliva extra virgem e virgem.....	98
Tabela 30. Composição triacilglicerólica por HPLC do óleo de girassol, do azeite de oliva extra virgem e da amostra E.....	100
Tabela 31. Composição triacilglicerólica por HPLC do óleo de soja, do azeite de oliva extra virgem e da amostra B.....	101
Tabela 32. Composição triacilglicerólica por HPLC do azeite de oliva extra virgem e das amostras G e L.....	103
Tabela 33. Composição triacilglicerólica por HPLC do azeite de oliva extra virgem e das amostras P e Bb.....	105
Tabela 34. Valores de estigmastadieno para azeites de oliva extra virgem e virgem.....	116
Tabela 35. Valores de esteróis para azeites de oliva extra virgem.....	125
Tabela 36. Resultados analíticos de amostras não conformes com a Legislação vigente para cada análise.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do estigmasta-3,5-dieno.....	40
Figura 2. Estrutura química do β -sitosterol.....	40
Figura 3. Saponificação da amostra sob refluxo.....	57
Figura 4. Matéria insaponificável após secagem da amostra.....	61
Figura 5. Eluição de amostra por cromatografia em coluna aberta.....	63
Figura 6. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC do óleo de soja.....	93
Figura 7. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC de uma amostra de azeite de oliva extra virgem.....	94
Figura 8. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC de uma amostra de azeite de oliva extra virgem com adição de óleo de soja.....	95
Figura 9. Programa computacional baseado em Cortesi <i>et al.</i>	97
Figura 10. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra E.....	99
Figura 11. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra B.....	101
Figura 12. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra G.....	102
Figura 13. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra L.....	102
Figura 14. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra P.....	104
Figura 15. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra Bb.....	104
Figura 16. Cromatograma do padrão interno colest-3,5-dieno injetado na coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano).....	109
Figura 17. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite refinado injetado na coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano).....	109
Figura 18. Cromatograma do padrão interno colest-3,5-dieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	110

Figura 19. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite refinado injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	111
Figura 20. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite padrão IUPAC contendo 25,4 mg/kg de estigmastadieno, injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	113
Figura 21. Cromatograma do padrão interno colest-3,5-dieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	117
Figura 22. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra B, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	118
Figura 23. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra E, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	118
Figura 24. Cromatograma do padrão interno colest-3,5-dieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	119
Figura 25. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra G, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	120
Figura 26. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra P, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	121
Figura 27. Cromatograma da mistura de padrões de esteróis, injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	126
Figura 28. Cromatograma da análise de esteróis da amostra B, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	127
Figura 29. Cromatograma da análise de esteróis da amostra E, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	128
Figura 30. Cromatograma da análise de esteróis da amostra Bb, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).....	130

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Critérios de qualidade para azeite de oliva extra virgem.....	49
Quadro 2. Critérios de qualidade para azeite de oliva virgem.....	51
Quadro 3. Critérios de pureza para azeite de oliva extra virgem e virgem.....	69
Quadro 4. Resultados obtidos da análise de estigmastadieno com o azeite de oliva refinado padrão IUPAC.....	114

RESUMO

O azeite de oliva é um produto com alto valor nutricional e tem conquistado seu espaço no mercado consumidor devido às suas marcantes características organolépticas. O cultivo e a colheita de olivas e a extração do azeite são atividades trabalhosas e, por isso, o azeite de oliva tem alto custo comercial. Por conseqüência, as tentativas de adulteração deste produto com outros tipos de azeites mais baratos, como o azeite de oliva refinado, por exemplo, é comum. Este trabalho visa despertar um maior interesse dos órgãos de vigilância e de controle de qualidade de azeites de oliva, mostrando a importância da aplicação de metodologias específicas para evidenciar adulterações deste produto. Este estudo propôs a quantificação de estigmastadienos como a principal técnica capaz de identificar fraudes em azeites de oliva extra virgem e virgem. Este método analítico consiste na saponificação da amostra de azeite na presença de padrão interno (colesta-3,5-dieno), extração e fracionamento dos componentes insaponificáveis por cromatografia em coluna aberta, seguida pela identificação e quantificação do estigmasta-3,5-dieno e seu isômero por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. A separação cromatográfica do estigmastadieno foi realizada em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% difenil 95% dimetil polisiloxano, 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com rampa de 2°C/ min, iniciando a corrida a 235°C e finalizando com 285°C. Foram adquiridas 30 marcas de azeites de oliva (azeites de oliva extra virgem e azeites de oliva virgem) disponíveis no comércio de Campinas, importadas dos países: Portugal, Espanha, Itália, Grécia, Argentina e Líbano, sendo 27 delas envasadas no país de origem. As amostras foram submetidas previamente às análises de qualidade, que englobaram as determinações de ácidos graxos livres (% AGL), índice de peróxido e medida do coeficiente de extinção específica (K_{232} , K_{270} e ΔK). Posteriormente, foram realizadas as análises de pureza, envolvendo a composição em ácidos graxos, teor de mono e poliinsaturados, teor de isômeros *trans*, índice de iodo e de saponificação calculados, determinação da composição triacilglicerólica (ECN42),

quantificação de estigmastadienos e de esteróis. De acordo com os resultados, pode-se observar que 2 amostras apresentaram grau de acidez acima do limite estabelecido, e outras 2 amostras encontraram-se acima do valor permitido para o índice de peróxido. A absorção específica no ultravioleta a 232 nm, 270 nm e o ΔK evidenciaram a adulteração de 4 amostras de azeite de oliva. Pela composição em ácidos graxos, teor de mono e poliinsaturados e pelo índice de iodo calculado, só foi possível detectar a fraude de uma amostra, devido ao baixo valor de ácido oléico e alto valor de ácido linoléico. Quatro amostras apresentaram elevado conteúdo de isômeros *trans*. Através da composição triacilglicérica por ECN42 foi detectada a adulteração de 6 amostras de azeite. A quantificação de estigmastadieno, entretanto, confirmou a fraude em 8 amostras. Após a identificação das 8 amostras de azeite adulteradas, estas foram submetidas à avaliação da composição em esteróis, que indicou a fraude em 4 amostras com outro óleo vegetal, 3 amostras com azeite de oliva refinado e uma amostra com óleo de bagaço de oliva. As determinações de composição triacilglicérica por ECN42, a quantificação de estigmastadienos e a composição esterólica mostraram-se altamente eficazes na detecção de adulteração de azeites de oliva extra virgem com outros óleos vegetais ou com azeite de oliva refinado.

Palavras-chave: azeite de oliva, estigmastadieno, adulteração, cromatografia em fase gasosa.

SUMMARY

The olive oil is a product with high nutritional value and has been conquering their space in the consumer market due to their organoleptic characteristics (aroma and taste). The cultivation of olive trees, the harvesting of the olive fruits, and the extraction of olive oil are hard and time-consuming tasks, contributing to it high commercial price. Therefore, attempts to adulterate this commodity with less expensive materials, such as refined olive oil, are by no means rare. Needless to say, this practice deteriorates its quality and nutritional value and causes major economic losses. This work proposes to stimulate the bigger advantage of the olive oil inspection and quality control sector, showing the importance of application of a more specific methodology in the search for adulteration in this product. This study proposes the stigmastadiene quantification, such as the main technic able to identify frauds in extra virgin and virgin olive oil. This analytical method consists of saponification of the sample with internal standard (cholesta-3,5-diene), extraction of unsaponifiable matter and fractioning of the unsaponifiable components by column chromatography on silica gel and identification and quantification of the stigmasta-3,5-diene and their isomer through gas chromatography with flame ionization detector. The stigmastadiene chromatographic separation was accomplished in melted silica capillary column HP-5 (5% diphenyl 95% dimethyl polysiloxane, 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), with slope of 2°C/ min, starting at 235°C and finishing at 285°C. Thirty brands of olive oil were purchased (extra virgin olive oil and virgin olive oil) available in Campinas market, imported from Portugal, Spain, Italy, Greece, Argentina and Lebanon, from which 27 brands were bottled in the origin country. The samples had previously undergone a quality analysis, that involves the free fatty acid determination (%FFA), peroxide index and specific extinction coefficient determination (K_{232} , K_{270} and ΔK). Later, purity analysis were accomplished, with the fatty acid composition determination and consequent evaluation of mono and polyunsaturated, of *trans* isomers content, calculated iodine and saponification values, triacylglycerol

composition determination (ECN42), stigmastadienes determination and evaluation of sterols composition. It was observed that 2 brands showed an acidity content above the limite values, and another 2 brands showed a peroxide index above the limite established. The absorptivity at 232 nm, 270 nm and ΔK confirmed the adulteration on 4 brands of olive oil. Through the fatty acid composition and consequent evaluation of saponification and iodine values, only one brand adulteration was detected, due to the low oleic and high linoleic acid. Four brands showed *trans* isomers contents above the limit values. Through the triacylglycerol composition determination (ECN42), adulteration was detected in 6 brands of olive oil. However, stigmastadiene quantification indicated adulteration in 8 brands. This brands were submitted to the evaluation of sterols composition, that indicated frauds in 4 brands with another vegetable oil, 3 brands with refined olive oil and one brand with olive pomace oil. The triacylglycerol composition determination (ECN42), the stigmastadiene quantification and the sterols composition were very efficient in the detection of extra virgin olive oil adulteration with another vegetable oils and with refined olive oil.

Key words: olive oil, stigmastadiene, adulteration, gas chromatography.

1. INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras constituem uma das três maiores classes de produtos alimentícios, sendo importantes para a alimentação humana juntamente com as proteínas e os carboidratos. Entretanto, desde a virada do século, os óleos vegetais têm substituído a banha e o sebo na maioria das dietas alimentares. A mudança, aprovada pelos consumidores, é devido, principalmente, à combinação de um sabor agradável com benefícios nutricionais (APARICIO; APARICIO-RUÍZ, 2000).

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva (*Olea europaea*) é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente usado nos países que margeiam o Mediterrâneo. É raro existir, dentre os óleos vegetais não refinados, um “flavour” mais apreciado do que o do azeite de oliva virgem (GOODACRE; KEL; BIANCHI, 1993).

O azeite de oliva é o produto obtido de azeitonas em condições de maturação, procedentes de oliveiras sadias, cujo processamento tenha sido realizado com frutos frescos evitando qualquer tratamento que altere a natureza química de seus componentes, tanto durante a extração como no armazenamento (OLIVEIRA, 2006).

Devido as suas características sensoriais excepcionais e a uma produção limitada, o azeite de oliva apresenta elevado valor de mercado, sendo alvo freqüente de adulterações. A mais comum é a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial, principalmente quando o azeite é enlatado no Brasil. Entretanto, outras fraudes relativas à qualidade do azeite são praticadas devido às diferentes categorias de azeites existentes, o que pode confundir os consumidores (AUED-PIMENTEL *et al*, 2002).

Tendo-se em vista a expansão do mercado de óleos vegetais, a autenticidade de um óleo tornou-se um importante assunto, de grande

interesse comercial e, ainda, do ponto de vista da saúde. A diferença entre o preço de um azeite de oliva e outro óleo comestível, por exemplo, pode ser um meio das indústrias auferirem lucros através da adição de óleos mais baratos a azeites de oliva virgem. Este procedimento, entretanto, é também prejudicial para os consumidores de azeite de oliva, pois adquirem um produto benéfico à saúde e, na verdade, são surpreendidos por produto não originário da azeitona (APARICIO; APARICIO-RUÍZ, 2000).

No Brasil, o principal tipo de fraude em azeite é a adição de óleos vegetais de baixo valor comercial, principalmente o óleo de soja, devido a sua produção em larga escala com preços inferiores aos demais óleos vegetais (AUED-PIMENTEL, 1991).

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 (BECKER, 2004).

O monitoramento da autenticidade de óleos vegetais é realizado por meio do uso de técnicas instrumentais através de parâmetros qualitativos e quantitativos. Os avanços em novos conhecimentos e tecnologia têm conduzido com sucesso uma grande luta contra a adulteração de óleos ao longo de muitos anos. No entanto, é igualmente verdade que esta mesma tecnologia e conhecimento têm sido usados para fraudar óleos, com o intuito de invalidar a utilidade de alguns métodos (APARICIO; APARICIO-RUÍZ, 2000).

A legislação brasileira carece de laboratórios que contemplem análises específicas para azeites de oliva já incluídas na Resolução RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005, que devem atender aos requisitos estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Neste sentido, o Laboratório de Óleos e Gorduras, através desta pesquisa, fornecerá sua contribuição à sociedade brasileira

estudando profundamente a quantificação de estigmastadienos em azeites de oliva disponíveis no mercado brasileiro, para detectar a qualidade do produto comercializado internamente e dar apoio laboratorial à Vigilância Sanitária (ANVISA).

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo aplicar as metodologias estabelecidas pelo Codex Alimentarius, a fim de avaliar a ocorrência de adulteração de azeite de oliva virgem e extra virgem com azeite de oliva de qualidade inferior, através de métodos analíticos de qualidade e de pureza para detectar tais fraudes.

Dentre os critérios de qualidade, destaca-se a determinação do coeficiente de extinção específica. Porém, igualmente ou mais importante são os critérios de pureza. Deve-se ressaltar que a quantificação de estigmastadienos é uma análise pouco executada, por ser bastante trabalhosa. Até o presente momento, não se conhece, no Brasil, nenhum Laboratório que realize esta análise como rotina. Outra análise pouco usual é a determinação do grupo equivalente ao peso molecular 42 (ECN 42), sendo atualmente realizada como rotina apenas no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

Com o intuito de apresentar um trabalho mais completo, as amostras que apresentaram valor de estigmastadieno acima do limite máximo estabelecido por Legislação, foram submetidas à análise de esteróis. Esta metodologia foi estudada por BECKER (2004) e, atualmente, é executada como análise de rotina no Laboratório de Óleos e Gorduras – FEA – UNICAMP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem e Difusão da Oliveira

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 Cartago. Nos séculos XIII e VII a.C., o cultivo da oliveira foi ampliado e aprimorado, e os métodos de produção e distribuição foram organizados. Os fenícios e cartaginenses são tidos como implantadores da oliveira na Espanha, tendo esta cultura se expandido para Portugal, Antilhas e América do Sul (GRACIAN, 1968).

No Brasil, a oliveira foi introduzida há vários séculos. Foi encontrada em diversos estados brasileiros, tais como: Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Entretanto, os olivais da época colonial foram destruídos por ordem do rei de Portugal, que temia a concorrência da produção brasileira (AUED-PIMENTEL, 1991).

2.1.1. 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 diâmetro, muito carnosa em certas variedades. No verão apresenta coloração verde e no outono vermelho clara ou quase preta. A azeitona é constituída de 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 azeite. A maturação exerce grande influência na qualidade do óleo obtido, sendo tal influência maior que a exercida por outros fatores, como origem e variedade (FIORINO & PETRUCCIOLI, 1977).

É uma planta de clima temperado quente, que necessita de baixas temperaturas no período que antecede a floração para que se obtenha resultados satisfatórios na produção. Segundo especialistas, temperaturas de inverno com médias entre 8 e 10°C, altitudes que variam entre 200 e 1.300 metros e regime de chuvas superior a 800 mm são suficientes para produções econômicas. O pH do solo, que deve ser superior a 5,5 também interfere na qualidade das azeitonas, principalmente quando o objetivo é a produção de azeite. Somente após quatro anos de plantio é que as mudas tornam-se produtivas. Podem ser plantadas em qualquer época do ano, preferencialmente no período chuvoso (LOPES & ARAÚJO, 2005).

A oliveira é uma planta rústica e bem resistente a pragas e doenças. As principais doenças e pragas que afetam as oliveiras são a tuberculose da oliveira (*Pseudomonas savastoni* Smith), antracnose da oliveira (*Gloeosporium olivarum*), fumagina (*Cappodium elaeophilum*), cochonilhas (*Saissetia oleae*), mosca da oliveira (*Dacus oleae*), além de diversas espécies de formigas, que também podem trazer prejuízo à plantação (BOTELHO, 2006).

As condições climáticas dos países do Mediterrâneo foram bastante favoráveis ao cultivo da oliveira, que se espalhou rapidamente através de todos os países da bacia do Mediterrâneo, onde hoje é uma característica da região. O cultivo da oliveira foi estendido a 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 (AUED-PIMENTEL, 1991).

2.1.2. Variedades de Olivas

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 caracterizar 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 europea* 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 a quantidade 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).

Dentre as variedades mais cultivadas no mundo, a Picual é a mais importante, sendo comum na região da Andaluzia e representando cerca de 50% da produção da Espanha. Destaca-se por produzir um azeite de oliva mais estável, devido ao seu baixo conteúdo de ácido linolênico e elevada proporção de polifénóis. A variedade Cornicabra é a segunda mais cultivada na Espanha, é

encontrada nas regiões de Toledo e Ciudad Real e destaca-se pelo elevado rendimento do óleo. Em terceiro lugar, encontra-se a variedade Hojiblanca, que se estende pela região de Sevilla, ao sul de Córdoba e todo o norte de Málaga. É usada para azeitona de mesa, por sua textura firme e também para a produção de azeite (ASOLIVA, 2007).

Outras variedades também são citadas por suas características particulares. A variedade Picudo é predominante na região de Córdoba e produz um azeite de oliva extra virgem de excelente qualidade. A Lechín de Sevilla é muito difundida na Andaluzia ocidental e caracteriza-se por ser um pouco mais instável, oxidando-se com mais facilidade. A Empeltre, por sua vez, destaca-se por ser a variedade mais antiga da Espanha, típica da região de Aragon. A variedade Arbequina é a mais conhecida na região da Cataluña e possui qualidade sensorial excelente. Farga se destaca por possuir grande longevidade e fácil adaptação. A variedade Blanqueta produz um azeite muito aromático e, dentre as variedades mais conhecidas na Espanha, é a que possui menor teor de ácido oléico (ASOLIVA, 2007).

2.1.3. Cultivo da Oliveira no Brasil

A oliveira é uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem, juntamente com o trigo e a videira. Originária da bacia do Mediterrâneo chegou ao Brasil através de imigrantes europeus por volta de 1820. Entretanto, só a partir de 1955 é que a oliveira foi implantada, no sul de Minas Gerais, por produtores locais (EPAMIG, 2006).

Embora a oliveira venha sendo cultivada no Brasil há muitos anos, o país ainda não é capaz de produzir comercialmente o azeite de oliva. Por esta razão, a demanda interna é atendida por azeites importados de países da Europa e da Argentina (AUED-PIMENTEL, 2002).

De acordo com a Secretaria de Comércio Exterior (Secex) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Brasil gastou, em 2004, 61 milhões de dólares com a importação de azeite de oliva e quase 27 milhões de dólares com a de azeitonas. Não há produção nacional significativa. As exportações dos dois itens, que somam 100 mil dólares no mesmo período, são apenas repasses de empresas que importam de países próximos e revendem no exterior (LOPES & ARAÚJO, 2005).

Tornando-se dependente da importação para abastecimento interno, o Brasil, impulsionado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, decidiu reverter este quadro. Sem uma produção própria de azeitonas e azeite de oliva, o país apostou no desenvolvimento de trabalhos de pesquisa e cultivo das oliveiras. A Fazenda Experimental de Maria da Fé, localizada em Delfim Moreira, na Serra da Mantiqueira, sul de Minas Gerais, iniciou o projeto em 1984 e, ao longo de dez anos, foram plantadas 80 mil mudas de oliveiras. O sul de Minas foi escolhido para o plantio das oliveiras por ser uma região de clima frio, 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 (EPAMIG, 2005).

Em 2005, as pesquisas sobre as oliveiras já apresentaram resultados bastante satisfatórios, com desenvolvimento promissor da cultura no Brasil. Este trabalho tem como objetivo, principalmente, selecionar variedades mais adaptadas às condições brasileiras e produção de mudas de qualidade. O planejamento da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais prevê o plantio de 100 mil plantas, em um prazo de 2 anos. A expectativa é a produção de 250 a 270 toneladas de azeite por ano, para o abastecimento do mercado interno (EPAMIG, 2006).

Diversas amostras de azeites de oliva, elaborados experimentalmente a partir de azeitonas colhidas em diferentes variedades da coleção mantida na Fazenda Experimental de Maria da Fé, foram submetidas a análises de laboratório, e os resultados permitiram classificar o respectivo azeite como “azeite de oliva virgem” ou “azeite de oliva extra virgem”, sendo que tais parâmetros permitem concluir estar o respectivo produto de acordo com a Resolução nº 270 de 22/09/2005 da ANVISA/MS, podendo ser comparado com os melhores azeites de oliva elaborados em regiões produtoras do mundo (OLIVEIRA, 2006).

2.1.4. Processamento das Olivas

As olivas, de acordo com as características de cada variedade, podem ter dois destinos: podem ser utilizadas para o consumo em mesa ou para a extração do azeite de oliva.

Segundo Botelho (2006), as olivas destinadas à mesa devem ser colhidas manualmente, evitando avarias. Uma característica desta fruta é ser imprópria para o consumo logo após a colheita, pois, neste estado, elas são muito amargas. O ideal é submetê-las a um processo de “curtimento”, usando solução de hidróxido de sódio. Nesta solução, as azeitonas devem permanecer por um período de até 10 horas e, em seguida, devem ser lavadas em água limpa por 15 a 20 dias, até se tornarem adocicadas.

Já para a produção do azeite, a colheita deve ser realizada após a completa maturação do fruto, quando o percentual de óleo é maior. A extração é realizada em três etapas: em primeiro lugar, as azeitonas são submetidas a uma prensagem gradativa, extraíndo óleo, água e mucilagens. Após um dia de repouso em tanques de decantação, o óleo, concentrado na parte superior do tanque, é recolhido, filtrado e armazenado (BOTELHO, 2006).

As pesquisas indicam que condições adequadas, aliadas ao uso da tecnologia, podem proporcionar uma excelente produção de azeitonas: cada oliveira é capaz de produzir de 80 a 100 quilos de frutos por safra (EPAMIG, 2005).

2.2. Dados Estatísticos do Azeite de Oliva

2.2.1. Produção de Azeite de Oliva

Os países mediterrâneos europeus são os maiores fornecedores mundiais de azeite de oliva, sendo responsáveis pela maior parte da produção mundial do produto, atingindo 75% do total produzido. A Espanha é o primeiro produtor mundial de azeite de oliva, com 39% da produção, seguido pela Itália, com 22% da produção e a Grécia com 13% da produção mundial de azeite de oliva. Os outros grandes produtores de azeite, com cerca de 20% da produção mundial total são Tunísia, Síria, Turquia e Marrocos (IOOC, 2007).

Embora a produção em outras regiões do mundo seja pouco significativa quando comparada com a da bacia do Mediterrâneo, alguns países sem tradição estão demonstrando interesse em investir no setor (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

A União Européia domina a produção mundial, com colheitas que aumentaram regularmente na década de 90, sobretudo na Espanha, tendo alcançado o valor recorde de 2,46 milhões de toneladas de azeite de oliva no biênio 2001/02 (EPAMIG, 2005).

O setor reúne aproximadamente 2,5 milhões de produtores, o que representa cerca de um terço de todos os agricultores da União Européia. A produção de azeite de oliva constitui uma importante fonte de emprego nas principais regiões de produção, além de proporcionar emprego sazonal no inverno,

em complemento a outras atividades agrícolas, sendo também uma importante fonte de emprego fora da exploração, na indústria da trituração e transformação. No entanto, a produção é conhecida pelas suas flutuações, determinadas pelo ciclo biológico de produção e pela susceptibilidade às variações meteorológicas (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

A Espanha tem ainda a maior área cultivada de oliveiras, representando 25% do total mundial. Andaluzia é a maior região produtora do mundo, produzindo entre 75% e 80% dos azeites da Espanha (ASOLIVA, 2007).

Mais de 90% da produção mundial de azeitonas destinam-se à elaboração de azeite de oliva. O restante é utilizado para elaboração de azeitonas para consumo em mesa (OLIVEIRA, 2006).

A seguir, as Tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, a produção de azeite de oliva no mundo e na União Européia.

Tabela 1. Produção mundial de azeite de oliva (1000 toneladas).

BIÊNIO	UNIÃO EUROPÉIA	TUNÍSIA	SÍRIA	TURQUIA	MARROCOS	OUTROS	TOTAL
2000/01	1940,5	130,0	165,0	175,0	35,0	120,0	2565,5
2001/02	2463,5	35,0	92,0	65,0	60,0	110,0	2825,5
2002/03	1942,5	72,0	165,0	140,0	45,0	131,0	2495,5
2003/04	2448,0	280,0	110,0	79,0	100,0	157,0	3174,0
2004/05	2357,0	130,0	175,0	145,0	50,0	156,0	3013,0
2005/06	1946,0	220,0	100,0	115,0	75,0	143,0	2599,0
2006/07⁽¹⁾	2144,0	130,0	154,0	140,0	80,0	172,0	2820,0
Média	2177,4	142,4	137,3	122,7	63,6	141,3	2784,6

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 2. Produção de azeite de oliva na União Européia (1000 toneladas).

BIÊNIO	ESPANHA	ITÁLIA	GRÉCIA	PORTUGAL	FRANÇA	OUTROS	TOTAL
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	861,1	634,0	414,0	28,9	4,7	—	1942,7
2003/04	1412,0	685,0	308,0	31,2	4,6	7,2	2448,0
2004/05	989,8	879,0	435,0	41,2	4,7	7,5	2357,2
2005/06	824,6	655,7	424,0	29,0	4,4	8,4	1946,1
2006/07 ⁽¹⁾	1095,6	630,0	370,0	35,0	4,7	8,5	2143,8
Média	1081,2	664,2	391,3	31,9	4,3	7,9	2172,9

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

2.2.2. Consumo de Azeite de Oliva

Historicamente, o consumo de azeite tendia a ser elevado apenas nos países produtores tradicionais. Embora o azeite represente ainda cerca de 3% do consumo mundial total de óleos comestíveis, desde 1995/96 a procura aumentou a um ritmo de cerca de 6% ao ano, graças à imagem positiva do azeite em termos de saúde e qualidade (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

De acordo com Saba *et al* (2005), em todo o mercado mundial, houve um crescimento significativo no consumo do azeite de oliva extra virgem devido às suas propriedades nutricionais e qualidades sensoriais.

Além de ser o maior produtor de azeite de oliva do mundo, a União Européia também aparece em primeiro lugar no ranking de consumidores mundiais. Adeptos da dieta rica em azeite de oliva virgem, conhecida como Dieta Mediterrânea, o consumo de azeite de oliva na União Européia ultrapassou 2 milhões de toneladas no biênio 2004/05. As Tabelas 3, 4 e 5 mostram,

respectivamente, o consumo mundial de azeite de oliva na década de 90, a partir do ano 2000 e o consumo na União Européia.

Tabela 3. Consumo mundial de azeite de oliva na década de 90 (1000 toneladas).

BIÊNIO	UNIÃO EUROPÉIA	EUA	SÍRIA	BRASIL	OUTROS	TOTAL
1990/91	1214,5	88,0	62,0	13,5	288,5	1666,5
1991/92	1357,0	79,0	66,0	11,0	344,0	1857,0
1992/93	1383,5	104,0	67,0	17,0	332,5	1904,0
1993/94	1453,5	115,5	69,0	14,5	332,5	1985,0
1994/95	1451,0	115,5	78,0	23,5	326,5	1994,5
1995/96	1387,0	101,0	78,0	19,0	303,5	1888,5
1996/97	1566,5	130,5	85,0	24,5	435,0	2241,5
1997/98	1705,5	142,5	95,0	29,0	409,5	2381,5
1998/99	1709,0	151,0	88,0	23,5	441,5	2413,0
1999/00	1728,0	169,5	90,0	25,0	430,0	2442,5
Média	1495,6	119,7	77,8	20,1	364,4	2077,4

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 4. Consumo mundial de azeite de oliva a partir do ano 2000 (1000 toneladas).

BIÊNIO	UNIÃO EUROPÉIA	EUA	SÍRIA	BRASIL	OUTROS	TOTAL
2000/01	1835,0	194,5	110,0	25,0	426,0	2590,5
2001/02	1894,5	188,5	86,0	22,5	415,0	2606,5
2002/03	1918,5	184,0	128,5	21,0	425,5	2677,5
2003/04	1997,5	216,5	150,0	23,5	495,0	2882,5
2004/05	2079,0	215,5	135,0	26,5	467,5	2923,5
2005/06	1885,0	215,0	94,0	26,0	445,5	2665,5
2006/07⁽¹⁾	2110,0	226,0	100,0	28,0	465,0	2929,0
Média	1959,9	205,7	114,8	24,6	448,5	2753,6

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 5. Consumo de azeite de oliva na União Européia (1000 toneladas).

BIÊNIO	ITÁLIA	ESPANHA	GRÉCIA	FRANÇA	PORTUGAL	OUTROS	TOTAL
2000/01	729,0	580,8	270,0	92,0	60,5	102,8	1835,1
2001/02	735,0	631,2	270,0	95,1	61,5	101,6	1894,4
2002/03	770,0	591,3	270,0	97,0	64,9	125,4	1918,6
2003/04	785,0	613,9	270,0	94,0	67,0	167,4	1997,3
2004/05	840,0	615,7	283,0	97,1	74,5	168,6	2078,9
2005/06	837,1	470,5	258,0	99,5	70,0	150,0	1885,1
2006/07 ⁽¹⁾	871,0	620,0	288,0	99,8	70,0	161,4	2110,2
Média	795,3	589,1	272,7	96,4	66,9	139,6	1959,9

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Além da União Européia, os principais mercados para o azeite são os Estados Unidos, Japão, Canadá, Austrália e Brasil (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

O mercado de azeite de oliva no Brasil tem crescido nos últimos anos. Na década de 1990, o consumo médio de azeite de oliva era de 20 mil toneladas por biênio. Atualmente, o consumo médio ultrapassou 24 mil toneladas do produto por biênio, o que significa um aumento superior a 20% em relação à década anterior.

2.2.3. Exportação de Azeite de Oliva

Diante das tabelas apresentadas anteriormente, pode-se perceber que o comércio tornou-se uma característica importante do mercado do azeite na União Européia, que duplicou as suas exportações nos últimos dez anos para cerca de 324 mil toneladas em 2001/02, sobretudo sob a forma de azeite engarrafado (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

Dentre os maiores países exportadores de azeite de oliva, encontram-se a Itália, a Espanha e a Tunísia, exportando principalmente para Austrália, Estados Unidos, Brasil e Japão.

As Tabelas 6 e 7 apresentam, respectivamente, os maiores exportadores de azeite de oliva no mundo e os países exportadores pela União Européia.

Como pode ser visualizado na Tabela 8, os maiores exportadores de azeite de oliva para o Brasil são Portugal, Espanha, Argentina e Itália.

Tabela 6. Maiores exportadores de azeite de oliva no mundo (1000 toneladas).

BIÊNIO	UNIÃO EUROPEIA	TUNÍSIA	TURQUIA	SÍRIA	MARROCOS	OUTROS	TOTAL
2000/01	291,0	95,0	92,0	10,0	0,0	14,0	502,0
2001/02	324,5	22,0	28,0	5,5	0,5	14,0	394,5
2002/03	313,5	40,0	74,0	30,5	3,0	22,0	483,0
2003/04	324,5	209,0	46,0	28,0	20,5	29,5	657,5
2004/05	330,5	98,0	93,5	36,0	31,0	44,5	633,5
2005/06	341,5	120,0	73,0	20,0	20,0	43,5	618,0
2006/07 ⁽¹⁾	371,5	120,0	75,0	40,0	15,0	59,5	681,0
Média	328,1	100,6	68,8	24,3	12,9	32,4	567,1

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 7. Exportação do azeite de oliva pela União Européia (1000 toneladas).

BIÊNIO	ITÁLIA	ESPAÑA	PORTUGAL	GRÉCIA	FRANÇA	OUTROS	TOTAL
2000/01	173,0	88,3	17,3	10,0	1,3	1,1	291,0
2001/02	182,9	112,5	16,2	10,0	1,0	1,7	324,3
2002/03	176,1	107,0	13,1	15,0	1,3	1,1	313,6
2003/04	181,5	114,2	15,9	10,0	1,3	1,5	324,4
2004/05	191,5	110,9	16,6	10,0	0,0	1,5	330,5
2005/06	215,0	97,0	17,0	10,0	1,1	1,5	341,6
2006/07 ⁽¹⁾	220,0	115,0	19,0	15,0	1,1	1,5	371,6
Média	191,4	106,4	16,4	11,4	1,0	1,4	328,1

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 8. Maiores exportadores de azeite de oliva para o Brasil (1000 toneladas).

BIÊNIO	PORTUGAL	ESPANHA	ARGENTINA	ITÁLIA	OUTROS	TOTAL
2000/01	25,01	12,86	6,54	–	0,50	44,41
2001/02	23,63	11,83	5,28	–	0,15	40,74
2002/03	21,06	11,53	4,88	–	0,07	37,47
2003/04	20,82	13,72	3,78	–	0,15	38,32
2004/05	23,65	16,01	3,78	2,57	0,26	46,01
2005/06	26,34	15,27	5,85	2,82	0,25	50,28
Média	23,42	13,54	5,02	2,70	0,23	42,87

FONTE: SECEX/MDIC, 2007.

2.2.4. Importação de Azeite de Oliva

O Brasil é o sétimo importador mundial de azeite de oliva e o segundo de azeitonas, investindo anualmente cerca de 600 milhões de reais com a importação de 50 mil toneladas do óleo e 35 mil toneladas do fruto da oliveira. Apesar de possuir considerável volume de terras cultiváveis e clima favorável para esta planta, ainda não existe no país produção em escala comercial (EPAMIG, 2006).

As importações destinadas, sobretudo a Itália, permaneceram relativamente estáveis desde o ano 2000, com exceção dos anos de baixa produção na Tunísia, o principal importador para a União Européia (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2003).

As Tabelas 9 e 10 apresentam os maiores importadores de azeite de oliva no mundo e os importadores na União Européia, respectivamente.

Tabela 9. Maiores importadores de azeite de oliva no mundo (1000 toneladas).

BIÊNIO	EUA	UNIÃO EUROPÉIA	JAPÃO	AUSTRÁLIA	CANADÁ	BRASIL	OUTROS	TOTAL
2000/01	200,0	127,0	29,0	30,0	25,5	25,0	80,5	517,0
2001/02	193,0	42,5	31,5	26,5	24,0	22,5	97,0	437,0
2002/03	191,5	93,5	30,5	31,5	25,0	21,0	99,5	492,5
2003/04	226,0	231,5	32,0	31,0	26,0	23,5	93,0	663,0
2004/05	221,0	186,0	32,0	28,5	32,0	26,5	108,0	634,0
2005/06	224,0	183,5	30,0	29,0	26,0	26,0	97,0	615,5
2006/07 ⁽¹⁾	240,5	160,5	33,0	27,0	30,0	28,0	104,5	623,5
Média	213,7	146,4	31,1	29,1	26,9	24,6	97,1	568,9

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

Tabela 10. Importação do azeite de oliva pela União Européia (1000 toneladas).

BIÊNIO	ITÁLIA	ESPANHA	PORTUGAL	FRANÇA	OUTROS	TOTAL
2000/01	110,8	15,8	0,0	0,2	0,3	127,1
2001/02	40,7	1,6	0,0	0,1	0,0	42,4
2002/03	74,3	18,2	0,2	0,4	0,2	93,3
2003/04	180,2	49,4	1,4	0,2	0,6	231,8
2004/05	144,0	39,2	1,8	0,4	0,8	186,2
2005/06	134,0	44,0	4,0	0,5	0,8	183,3
2006/07 ⁽¹⁾	110,0	45,0	4,0	0,5	0,8	160,3
Média	113,4	30,5	1,6	0,3	0,5	146,3

⁽¹⁾ Estimativa.

FONTE: IOOC, 2007.

2.3. Composição do Azeite de Oliva

A composição do azeite de oliva extra virgem é resultante de uma interação complexa entre as variedades de olivas, condições ambientais, grau de maturidade do fruto e tecnologia de extração (SABA *et al*, 2005).

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 agrônômicas, 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 as características do produto (RANALLI *et al*, 2000a).

No entanto, o processamento é o principal fator que afeta a qualidade do azeite de oliva. Os azeites obtidos por condições de prensagem apropriadas originam produtos de excelente qualidade. Ranalli e colaboradores (2001) observaram que o azeite de oliva extra virgem extraído por centrifugação apresenta qualidade inferior ao obtido por prensagem. Isto sugere que a trituração prévia do caroço da azeitona causa um significativo aumento da temperatura, o que resulta em um efeito negativo para a qualidade do azeite.

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

2.3.1. Componentes Glicerídicos

Os compostos glicerídicos incluem os triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e fosfolipídeos (RUÍZ-GUTIÉRREZ & PÉREZ-CAMINO, 2000).

A fração saponificável do azeite de oliva, como na maioria dos óleos vegetais, representa em torno de 98-99% da composição do óleo, sendo os triacilgliceróis os principais componentes (95-98%), isto é, ésteres de ácidos graxos e glicerol. As características físico-químicas do óleo dependem basicamente dos ácidos graxos constituintes e da forma que estão agrupados no glicerídeo (AUED-PIMENTEL, 1991).

Os principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva são: ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1) e ácido esteárico (C18:0). Outros ácidos graxos, como o ácido linolênico (C18:3), normalmente estão presentes na constituição do azeite de oliva, mas em quantidades inferiores a 1% (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

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).

O ácido graxo presente em maior quantidade é o oléico, podendo representar mais de 80% do total de ácidos graxos do azeite de oliva. A presença em maior quantidade desse ácido graxo, favorece a estabilidade oxidativa do azeite de oliva, quando comparado a de outros óleos vegetais ricos em ácidos graxos com maior número de insaturações (PÉREZ-CAMINO; MARQUEZ-RUIZ; DOBARGANES, 1987).

Outros ácidos graxos presentes no azeite de oliva são importantes por serem essenciais do ponto de vista nutricional, como o linoléico, que está presente em quantidades consideráveis, e o linolênico em pequena proporção, os quais são ácidos graxos essenciais poliinsaturados (AUED-PIMENTEL, 1991).

A Tabela 11 mostra as faixas de variação para cada ácido graxo, que obedecem ao Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), como

regulamenta a ANVISA, na Resolução RDC nº 270 da ANVISA, de 22 de setembro de 2005. Entretanto, para o ácido graxo linolênico (C18:3), o valor apresentado foi retirado da antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, uma vez que o Codex Alimentarius ainda não contempla o limite máximo permitido para este ácido graxo, e aguarda o parecer final da IOOC.

Tabela 11. Composição em ácidos graxos do azeite de oliva virgem.

ÁCIDO GRAXO	NOMENCLATURA	g/ 100 g
C 14:0	Mirístico	0,0 – 0,05
C 16:0	Palmítico	7,5 – 20,0
C 16:1	Palmitoléico	0,3 – 3,5
C 17:0	Margárico	0,0 – 0,3
C 17:1	Heptadecenóico	0,0 – 0,3
C 18:0	Esteárico	0,5 – 5,0
C 18:1	Oléico	55,0 – 83,0
C 18:2	Linoléico	3,5 – 21,0
C 18:3	Linolênico	0,0 – 0,9 *
C 20:0	Araquídico	0,0 – 0,6
C 20:1	Gadoléico	0,0 – 0,4
C 22:0	Behênico	0,0 – 0,2
C 24:0	Lignocérico	0,0 – 0,2

* Valor de C18:3 segundo a Resolução da ANVISA nº 482 (1999).

FONTE: Codex Alimentarius (2003).

De acordo com Aued-Pimentel (1991), os limites apresentados mostram uma grande variação entre os valores máximos e mínimos, uma vez que levam em conta os dados das características dos óleos de todos os países produtores. Esta composição é influenciada por muitos fatores como: região, clima, variedade, época de colheita, além do azeite de oliva apresentar uma diferença de composição muito mais acentuada que outros óleos vegetais extraídos de

sementes. As principais variações são observadas no conteúdo dos ácidos linoléico e oléico.

Os triacilgliceróis do azeite de oliva também são bastante estudados. Dentre os triacilgliceróis do azeite de oliva, sete representam mais de 90% do total, sendo eles: OOO (trioleína), POO, OLO, LOO, PLO, SOO e POP. A distribuição dos ácidos graxos na molécula de glicerol segue a regra “1,3-random-2-random”, comum na maioria dos óleos vegetais. Os ácidos graxos insaturados tendem a ser esterificados preferencialmente na posição 2 do glicerol, tendo sido constatada uma maior tendência do ácido linoléico com relação ao oléico na ocupação dessa posição (AUED-PIMENTEL, 1991).

2.3.2. Componentes não Glicerídicos

Os compostos não glicerídicos incluem os hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, ceras, ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos, esteróis e metil esteróis, álcoois e diálcoois triterpênicos, vitaminas e tocoferóis, pigmentos, ácidos terpênicos e outros constituintes e contaminantes, tais como fenóis e metais (RUÍZ-GUTIÉRREZ & PÉREZ-CAMINO, 2000).

A fração insaponificável (não glicerídica) do azeite de oliva virgem representa de 1-2% do azeite em massa. Consiste em vários componentes, tais como: compostos orgânicos voláteis, fenóis, tocoferóis, pigmentos, esteróis, esqualeno, entre outros, que são responsáveis pelo sabor, estabilidade e propriedades nutricionais do azeite de oliva (SABA *et al*, 2005).

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 do grão, 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).

A análise da fração insaponificável normalmente é muito útil na detecção de adulterações do azeite de oliva com outros óleos vegetais (BECKER, 2004). Alguns componentes da fração insaponificável, 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 (BORTOLOMEAZZI *et al*, 2001).

Segundo Aued-Pimentel (1991), os hidrocarbonetos constituem cerca de 50-60% do conteúdo total da matéria insaponificável do azeite de oliva. O principal hidrocarboneto presente no azeite de oliva virgem é o esqualeno, um composto triterpênico, poliinsaturado com seis duplas ligações. O esqualeno representa cerca de 90% do total dos hidrocarbonetos presentes na fração insaponificável do azeite de oliva, variando seu conteúdo de 125 a 750 mg/ 100g de óleo total. O esqualeno é um intermediário fundamental na biossíntese não só do colesterol, mas também de todos os hormônios esteróides. Outro importante hidrocarboneto, presente em quantidades muito pequenas no azeite é o β -caroteno, precursor da vitamina A, que atua como seqüestrador de oxigênio, inibindo a oxidação lipídica desencadeada por este precursor.

Os tocoferóis têm significado especial devido a sua atividade vitamínica (vitamina E) e por serem antioxidantes naturais. A forma predominante é o α -tocoferol, cuja faixa de variação é de 150 a 200 mg/ kg de azeite, teor bem inferior se comparado ao óleo de soja (AUED-PIMENTEL, 1991).

O esterois é outro composto não glicerídico que tem sido muito estudado para detectar adulteraçãõ com outros óleos, já que o azeite de oliva apresenta composiçãõ em esteróis bastante particular (BECKER, 2005).

A análise de composiçãõ em esteróis dos lipídeos de grãos e frutos oleaginosos é de grande valia na caracterizaçãõ 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 impressãõ digital das várias substâncias gordurosas (AUED-PIMENTEL, 1991).

Na análise da composiçãõ em esteróis do azeite de oliva virgem, têm-se observado a presençã constante do β -sitosterol, responsável por mais de 90% do total de esteróis, do campesterol, representando cerca de 3% dos esteróis, de estigmastadienol em torno de 3 a 4%, e em muitos casos foi observada a presençã de pequenas quantidades de colesterol e Δ 7-estigmasterol. O Δ 5-avenasterol é um componente constante na fraçãõ esterólica do azeite de oliva, presente em quantidades significativas, isto é, ao redor de 8%. Entretanto, dependendo do tipo de coluna cromatográfica empregada na separaçãõ dos esteróis, o Δ 5-avenasterol não se separa da fraçãõ correspondente ao sitosterol (ITOH *et al*, 1981). O conteúdo total de esteróis presentes no azeite de oliva varia de 180 a 265 mg/ 100g do óleo (KIRITSAKIS & MARKAKIS, 1987).

Tem sido relatado que o refino de óleos diminui o conteúdo de esteróis totais de óleos brutos e aumenta a proporçãõ de esteróis esterificados (PHILLIPS *et al*, 2002). A determinaçãõ de esteróis totais livres e esterificados em azeite de oliva foi realizada por Pasqualone e Catalano (2000), comparando o efeito da neutralizaçãõ 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 de esteróis e suas proporções representariam 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 (BECKER, 2004).

Os compostos não glicéricos abrangem, ainda, os pigmentos coloridos, tais como os carotenóides (já discutidos anteriormente) e a clorofila, que é um constituinte característico do azeite de oliva virgem, e está presente na concentração de 1 a 10 mg/ kg de azeite, junto com a feoftina, produto de degradação presente na mesma quantidade (KIRITSAKIS & MARKAKIS, 1987).

A presença de clorofila nos óleos tem um significado importante no processo de autooxidação, podendo ser um sensibilizador do oxigênio, na presença de luz, agindo como prooxidante, e na ausência de luz atuar como antioxidante (ENDO; USUKI; KANEDA, 1985).

O azeite de oliva contém, também, quantidades variáveis de substâncias fenólicas, que apresentam importante papel na estabilidade oxidativa dos azeites, principalmente para a clorofila. O conteúdo de componentes fenólicos no azeite de oliva virgem pode variar de 50 a 500 mg/ kg de óleo (AUED-PIMENTEL, 1991).

O azeite de oliva é um produto que possui características marcantes de aroma e sabor (FRAGAKI *et al*, 2005). A combinação da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa tem, há longo tempo, possibilitado a identificação de muitos componentes que contribuem para o aroma e sabor do azeite, categorizando-os em hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, álcoois alifáticos e triterpênicos, aldeídos, cetonas, ésteres, entre outros (OLIAS-JIMÉNEZ *et al*, 1978).

2.3.3. 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 primeira menção do possível efeito benéfico do azeite de oliva, com base científica, foi obtida de estudos dirigidos por Keys. Ao avaliar aspectos de saúde da população de sete regiões diferentes, observou que em uma delas, Creta (Grécia), havia um alto consumo de lipídeos de procedência quase que exclusivamente de azeite de oliva. Os níveis de colesterol plasmático não eram elevados e a incidência de enfermidades coronárias era muito baixa (OLIVEIRA, 2006).

O azeite de oliva apresenta algumas propriedades nutricionais que fazem com que os habitantes do Mediterrâneo tenham menor incidência de doenças coronarianas do que os povos de outras regiões, que consomem mais gorduras saturadas (KIRITSAKIS & MARKAKIS, 1987).

O azeite de oliva virgem é um produto com micronutrientes que protegem o organismo contra agentes externos e o desenvolvimento de doenças. Dentre os compostos da fração insaponificável (não glicéridica), o esqualeno tem sido apontado como um fator casual para a menor incidência de câncer nas populações mediterrânicas. O alfa-tocoferol (vitamina E) e os carotenóides contribuem para a reserva de antioxidantes no organismo humano, enquanto os esteróis seqüestram os ácidos biliares e abaixam os níveis do colesterol LDL plasmático. Os triterpenos, como o eritrodíol e o ácido oléico, apresentam propriedades antiinflamatórias e os compostos fenólicos, ação antioxidante (ASOLIVA, 2007).

O azeite de oliva, rico em ácido oléico, ω -9, supre tanto as respostas inflamatórias mediadas por eicosanóides, quanto àquelas que não o são. Estes efeitos incluem: anorexia, queda da pressão corporal, elevação da concentração de ceruloplasmina no plasma, aumento do conteúdo protéico e de zinco no fígado, e nas taxas de produção de proteínas pelo fígado, pulmão e rim. O azeite de oliva apresenta baixo conteúdo de ácido graxo do tipo ω -6, mas são ricos em ácido oléico, sugerindo que o efeito antiinflamatório seja devido a este ácido (CURI *et al*, 2002).

Os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre o organismo humano podem ser resumidos como a seguir (OLIVEIRA, 2006).

(1) Aparelho digestivo: diminui a secreção de ácido gástrico e a atividade secretora do pâncreas, sem afetar a digestibilidade dos macronutrientes. Melhora o esvaziamento da vesícula biliar, o que favorece a não formação de cálculos biliares e melhora a absorção intestinal de diversos nutrientes;

(2) Aparelho cardiovascular: diminui o colesterol plasmático total e o colesterol LDL, não modifica os níveis do colesterol HDL, estimula a produção de eicosanóides antiagregantes e vasodilatadores, diminui a capacidade de oxidação do colesterol LDL que apresenta um grande efeito aterogênico e diminui a pressão arterial.

(3) Diabetes: melhora o perfil lipídico do diabético, diminui a glicemia e as doses diárias de insulina utilizadas.

(4) Efeitos oxidativos: impede de maneira sistemática a oxidação celular, resultando na prevenção de muitas enfermidades, inclusive o envelhecimento precoce.

De acordo com Assmann e Wahrburg (2007), alguns experimentos foram realizados para avaliar a participação do esqualeno 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 um terço, se relacionado à incidência do mesmo em mulheres americanas.

Os fitosteróis, em especial o β -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 β -sitosterol, o número de células diminuiu em 24% e houve indução da morte celular (ASSMANN & WAHRBURG, 2007).

O azeite de oliva tem um efeito protetor no metabolismo, nas artérias, no estômago, no fígado e no trato biliar, promove o crescimento durante a infância e estende a expectativa de vida dos idosos. Sua composição balanceada, principalmente de ácido oléico monoinsaturado, seu fornecimento adequado dos ácidos linoléico e linolênico (ácidos graxos poliinsaturados essenciais), e seu conteúdo de antioxidantes garantem a preferência dos nutricionistas pelo azeite de oliva (VIOLA, 1995).

2.4. Legislação do Azeite de Oliva

No Brasil, a Resolução nº 482 de 23 de setembro de 1999 da ANVISA foi revogada em 22 de setembro de 2005, sendo substituída pela Resolução nº 270,

onde se estabeleceu que os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) dos óleos deverão seguir as normas pré estabelecidas pelo Codex Alimentarius (FAO/OMS). No entanto, o Codex está em estudo e não concluiu o “STEP 7” para azeite de oliva. Portanto, para que neste trabalho haja uma consonância com o futuro padrão Codex, será seguida a Regulamentação Européia nº 2568/91 de 06 de novembro de 2003, relativa às características de azeites de oliva, de azeite de bagaço de oliva e de métodos de análises, como sugerido pelo Conselho Oleícola Internacional (COI).

Os países europeus adotaram legislações comuns para proteger os produtores e consumidores de azeites de oliva dos produtos fraudados (FRAGAKI *et al*, 2005). A atual Legislação vigente na União Européia classifica o azeite de oliva em categorias que refletem a qualidade do produto, tais como: várias divisões para azeite de oliva virgem, do qual o azeite de oliva extra virgem é considerado o azeite de mais alta qualidade e o refinado é a classe mais baixa, obtido geralmente de azeite de oliva virgem extraído mecanicamente de olivas com avarias ou de olivas estocadas em condições impróprias (UNIÓN EUROPEA, 2003).

2.4.1. Classificação do Azeite de Oliva

São vários os fatores que influenciam a qualidade do azeite de oliva, sendo os principais: variedade da azeitona, condições climáticas, tipo de solo, práticas de cultivo, estado de maturação do fruto, acidez, tempo de processamento das azeitonas após a colheita e procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) (LOPES & ARAÚJO, 2005).

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 atual Legislação brasileira da ANVISA, resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, classifica os azeites de oliva apenas em três categorias, sendo:

♦ Azeite de Oliva: é o produto obtido somente dos frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), excluídos os óleos obtidos através de solventes ou processos de reesterificação e/ou qualquer mistura de outros óleos.

♦ Azeite de Oliva Virgem: é o produto obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*), somente por processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas, que não produzam alteração no azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração.

♦ Óleo de Bagaço de Oliva Refinado: é o produto obtido pelo tratamento do bagaço de frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), com solventes ou outros tipos de tratamentos físicos, excluídos os óleos obtidos por reesterificação ou qualquer mistura de outros óleos. O produto deve obrigatoriamente ser refinado.

Os azeites de oliva devem ser designados segundo as definições descritas acima e de acordo com os requisitos específicos de acidez e índice de peróxidos, relacionados na Tabela 12.

Tabela 12. Características físico-químicas dos azeites de oliva.

CATEGORIA DO AZEITE	ACIDEZ (% Ác. Oléico)	ÍNDICE DE PERÓXIDO (mEQ O ₂ /kg)
Oliva Extra Virgem	< 0,8	< 20
Oliva Virgem	< 2,0	< 20
Oliva (virgem + refinado)	< 1,0	< 15
Oliva Refinado	< 0,3	< 5
Bagaço de Oliva Refinado	< 0,3	< 5

FONTE: ANVISA – Resolução nº 270 (2005).

2.4.2. Características de Identidade do Azeite de Oliva

De acordo com 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 de água) contaminantes ambientais e substâncias naturais de caráter tóxico presentes no vegetal de onde se extrai o óleo.

As características de identidade de azeites de oliva, segundo a Legislação brasileira, devem atender aos requisitos de composição estabelecidos em normas do Codex Alimentarius (FAO/OMS).

Entretanto, há concordância entre os valores estabelecidos para a maioria das análises de pureza das três organizações internacionais, Conselho Oleícola Internacional (COI), União Européia (EU) e Codex Alimentarius Commission. Alguns destes parâmetros estão na Tabela 13, a seguir.

Tabela 13. Limites estabelecidos para alguns critérios de qualidade e pureza de azeites de oliva.

CATEGORIA DO AZEITE	ESTIGMASTA-DIENO (MG/ KG) ⁽¹⁾	DIFERENÇA ENTRE ECN42 HPLC E ECN42 TEÓRICO	K ₂₃₂ ⁽²⁾	K ₂₇₀ ⁽²⁾	ΔK ⁽³⁾
Oliva Extra Virgem	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Oliva Virgem	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Oliva (virgem + refinado)	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15
Oliva Refinado	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16
Bagaço de Oliva Refinado	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20

⁽¹⁾ Soma dos isômeros identificados ou não na coluna capilar.

⁽²⁾ Extinção específica nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm.

⁽³⁾ Extinção específica após a passagem pela coluna de alumina.

FONTE: Unión Europea (2003), Codex Alimentarius (2003) e COI (2003).

A composição em ácidos graxos segue os limites de variação estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Estes valores já foram apresentados anteriormente, na Tabela 11, contida no item Composição do Azeite de Oliva.

2.5. Adulteração do Azeite de Oliva

Recentemente, a regulamentação internacional estabeleceu critérios analíticos para detectar a adulteração do azeite de oliva com azeite extraído do bagaço de olivas ou azeite extraído com solvente. No entanto, até o presente momento, não se tem disponível na literatura um parâmetro absoluto capaz de englobar a diferenciação e detectar as modificações mais comuns no azeite de oliva extra virgem adicionado de azeite de oliva desodorizado (SABA *et al*, 2005).

Sendo o azeite de oliva um produto de alto valor nutricional e características sensoriais inigualáveis, é de se esperar que a adição de azeite de

oliva refinado ao azeite de oliva extra virgem deteriore suas propriedades antioxidantes e características organolépticas (FRAGAKI *et al*, 2005). Como sua produção é pequena em relação a outros óleos vegetais comestíveis, o azeite de oliva é alvo constante de adulteração (PEIXOTO, 1998).

O elevado valor de mercado do azeite de oliva favorece certas práticas fraudulentas, que visam à obtenção de maiores lucros por parte dos produtores ou enlatadores deste tipo de óleo (AUED-PIMENTEL, 1991).

O azeite de oliva tem sido alvo de diversos tipos de adulteração, que incluem a adição de outros óleos vegetais de baixo valor comercial, óleos vegetais parcialmente hidrogenados, óleos vegetais submetidos à remoção de esteróis (desterolizados), óleos reesterificados, ou até mesmo azeite de oliva refinado, obtido de frutos avariados ou da extração com solventes da torta residual de prensagem das olivas (PEIXOTO, 1998).

A adulteração de azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva lampante não é uma prática comum e é completamente detectada por métodos convencionais. Entretanto, a detecção de azeite de oliva lampante em azeite de oliva extra virgem é importante, pois o azeite de oliva lampante não pode ser consumido sem ser refinado (FRAGAKI *et al*, 2005).

Na prática, a adulteração consiste em um processo de desodorização térmica suave (80-120°C), que promove a remoção indesejável das características de sabor do azeite de oliva. A diluição do azeite de oliva extra virgem depende da quantidade de azeite de oliva lampante adicionado. Em geral, a mistura não produz uma modificação detectável na composição química porque foram utilizadas condições suaves de desodorização (SABA *et al*, 2005).

A presença de óleos de qualidade inferior no azeite de oliva extra virgem geralmente reflete em parâmetros físicos e químicos, tais como $K_{232-270}$,

o índice de peróxido e a razão de *trans*-2-hexenal/ hexanal, bem como nas avaliações organolépticas. A autenticação e a detecção da adulteração do azeite de oliva normalmente é baseada na técnica de cromatografia, incluindo a cromatografia gasosa de alta resolução e a cromatografia líquida de alta eficiência (FRAGAKI *et al*, 2005).

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. Por isso, vários índices são recomendados para a verificação da pureza do azeite de oliva (PEIXOTO, 1998).

Com o intuito de se detectar fraudes em azeites de oliva com outros óleos vegetais de composição química semelhante, recentemente outras técnicas analíticas têm sido empregadas isoladamente ou associadas a outras metodologias, visando complementar informações e elucidar a adulteração (BECKER, 2005).

2.5.1. Técnicas Analíticas para Detectar Fraudes

Os países mediterrâneos europeus, os maiores fornecedores de azeite de oliva do mundo, adotaram legislações comuns para proteger os produtores e consumidores de azeite de oliva dos produtos fraudados (FRAGAKI, 2005).

Atualmente, as cromatografias em fases líquida e gasosa são os métodos mais seletivos e completos nas análises de produtos de desidratação dos esteróis (BONVEHÍ; TORRENTÓ; COLL, 2001).

As determinações qualitativas e quantitativas dos constituintes são freqüentemente realizadas por cromatografia gasosa com coluna capilar, desde que os compostos injetados sejam voláteis e termicamente estáveis à temperatura

de análise. Nos métodos analíticos convencionais, a detecção por ionização de chama (FID) é a mais largamente utilizada. A espectrometria de massa, por sua vez, permite a obtenção dos dados de massa molar, informação estrutural e identificação dos compostos (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

A maioria dos trabalhos recentemente apresentados na área de adulteração de óleos comestíveis envolve análises cromatográficas. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) tem sido aplicadas na quantificação de ácidos graxos livres, triacilgliceróis, esteróis, tocoferóis e hidrocarbonetos. Embora a técnica por HPLC tenha crescido na última década, a HRGC ainda é a técnica mais largamente utilizada (APARICIO; APARICIO-RUÍZ, 2000).

Nos últimos anos, uma nova técnica tem sido amplamente utilizada: a combinação das técnicas de HPLC e cromatografia gasosa com coluna capilar. A realização desta técnica para o isolamento e a análise das frações resulta em uma separação com alta eficiência e sensibilidade. Esta combinação fornece uma ferramenta muito interessante na integração do preparo da amostra no processo de cromatografia e, conseqüentemente, oferece uma nova e prática alternativa de preparo de amostras além dos métodos tradicionais (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Através de técnicas de cromatografia gasosa, pôde-se elucidar de maneira precisa o perfil de ácidos graxos dos azeites a partir de seus ésteres metílicos e através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tem sido possível fracionar, com maior facilidade e resolução, os triacilgliceróis do azeite de oliva (AUED-PIMENTEL, 1991).

Trujillo-Quijano e Costa (1995), relatam 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 determinação do ECN42 experimental é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de fase reversa e oferece uma nova solução para os problemas de detecção de fraudes em azeites de oliva. Esta metodologia permite que triacilgliceróis altamente insaturados contendo ácido linoléico, ácido linolênico, ou ambos (como por exemplo LLL, OLLn e PLLn), sejam detectados no caso de azeites adulterados, uma vez que estão quase ausentes em azeites de oliva, mas alguns deles são predominantes em óleos adulterantes (REZANKA & MARES, 1991).

Segundo os autores Palmer e Palmer (1989) e Kapoulas e Andrikopoulos (1986), a quantificação por HPLC com detector ultravioleta foi utilizada de maneira bastante eficaz na quantificação da fração ECN42, sendo capaz de identificar amostras de azeites de oliva que foram fraudadas com outros óleos vegetais, em níveis de 2-5%. A reprodutibilidade da análise de ECN42 por HPLC com detecção ultravioleta e também por índice de refração foram testadas pela IUPAC (Internacional Union Of Pure & Applied Chemistry) em 1986 e adotadas como método oficial em 1991 pela Comunidade Européia.

De acordo com Andrikopoulos e colaboradores (2001), a determinação da fração de ECN42 pelo método utilizando HPLC e coluna em fase reversa possui uma grande vantagem em relação às outras análises quando se deseja identificar a pureza dos azeites, pois esta requer somente a diluição do óleo, enquanto as demais necessitam de um preparo muito mais demorado e trabalhoso.

A determinação de componentes minoritários da fração não glicerídica do azeite de oliva como esteróis e seus ésteres, álcoois triterpenodióis,

hidrocarbonetos e outros, envolve metodologia trabalhosa e demorada, principalmente na fase preparativa. Normalmente, os componentes da fração insaponificável são separados por cromatografia em coluna ou placa e as frações obtidas são analisadas diretamente por cromatografia em fase gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência, ou as frações do insaponificável são submetidas a reações de derivatização para torná-las apropriadas para a análise, especialmente por cromatografia gasosa (AUED-PIMENTEL, 1991).

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 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 azeites 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 triacilgliceróis 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 *et al*, 1998).

Para se avaliar a adição de azeite de oliva refinado ao azeite de oliva virgem são estabelecidos limites para o valor do coeficiente de extinção específica no ultravioleta nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. A absorção da 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 at*, 1998).

A extinção específica a 232 nm é relatada como a taxa de oxidação primária do óleo, enquanto a extinção no comprimento de onda de 270 nm e ΔK são a taxa de oxidação secundária (RANALLI; MATTIA; FERRANTE, 1997; RANALLI; SGARAMELLA; SURRICCHIO, 1999; RANALLI *et al*, 2000b). De acordo com a Resolução da União Europeia (2003), estas determinações espectrofotométricas constituem um parâmetro para se detectar adições fraudulentas de azeite refinado ao azeite de oliva virgem.

Assim, o aumento da absorção nas regiões de 232 nm e 270 nm do ultravioleta são indicativos da presença de compostos dienos e trienos conjugados, formados a partir de ácidos graxos insaturados durante o processo de refino dos óleos (BOSKOU, 1996).

A determinação de estigmastadienos fornece um método mais sensível e mais seguro no controle de fraudes em azeites de oliva, sendo capaz de substituir o clássico método ultravioleta (UV), que detecta adulteração através da presença de dienos e trienos conjugados. Isto porque tais ligações conjugadas podem ser formadas durante a estocagem, o que não ocorre com a desidratação dos esteróis (BONVEHÍ; TORRENTÓ; COLL, 2001).

A metodologia de quantificação de estigmastadienos é especialmente adequada para detectar a presença de azeites vegetais refinados (azeites de oliva, bagaços de oliva, girassol, palma, etc) em azeites de oliva virgem, uma vez que os azeites refinados contêm estigmastadienos e os azeites virgens não os contêm (UNIÓN EUROPEA, 2003).

A determinação de estigmastadienos requer o preparo da matéria insaponificável, seguido pela separação dos hidrocarbonetos esteróides por cromatografia líquida em coluna de sílica gel e posterior quantificação desta fração por cromatografia gasosa (AMELIO; RIZZO; VARAZINI, 1998).

2.5.2. Formação de Estigmastadienos

Os processos de refino de azeite de oliva, tanto pelo procedimento clássico de neutralização alcalina, como pelo processo físico de destilação, produzem alterações na fração alcoólica da matéria insaponificável, especialmente na composição de álcoois triterpênicos. Ainda que as comparações dos perfis cromatográficos destes álcoois permitam uma clara distinção entre os azeites de oliva virgem e o refinado, as diferenças não são tão significativas para poder se detectar pequenas quantidades de azeite refinado em azeite virgem (LANZÓN; CERT, ALBI, 1989).

Lanzón e colaboradores (1989) estudaram as alterações produzidas pelos componentes da matéria insaponificável dos azeites de oliva após o processo de refino e detectaram que na fração de hidrocarbonetos apareciam alguns novos compostos, originados por este processo. Supôs-se, então, que alguma destas substâncias poderia ser utilizada como indicador de que o azeite havia sido submetido a tratamento térmico. Desenvolveram, então, um método analítico sensível para detectar pequenas quantidades de azeite refinado em azeite de oliva virgem. O fundamento deste método é detectar o estigmasta-3,5-dieno, substância produzida pela desidratação do β -sitosterol (3 β -stigmast-5-en-3-ol), como consequência do tratamento térmico favorecido pelas terras clarificantes, analogamente como se forma o colest-3,5-dieno, a partir do colesterol na gordura refinada.

Segundo Dobarganes e outros (1999), durante o processo de refino, os estigmastadienos são formados em todas as etapas que envolvem alta temperatura, tais como a clarificação e a desodorização, mas, originalmente, maiores quantias destes compostos são formadas horas após o processamento.

As Figuras 1 e 2 mostram as estruturas químicas do estigmasta-3,5-dieno e do β -sitosterol, respectivamente.

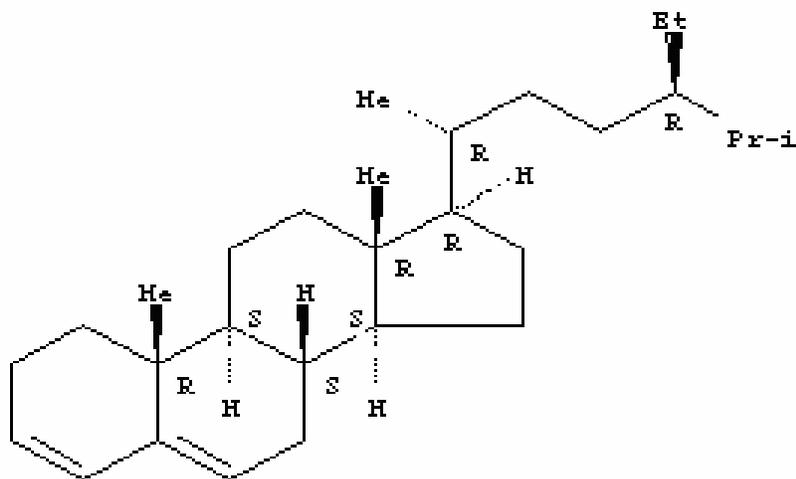


Figura 1. Estrutura química do estigmasta-3,5-dieno.

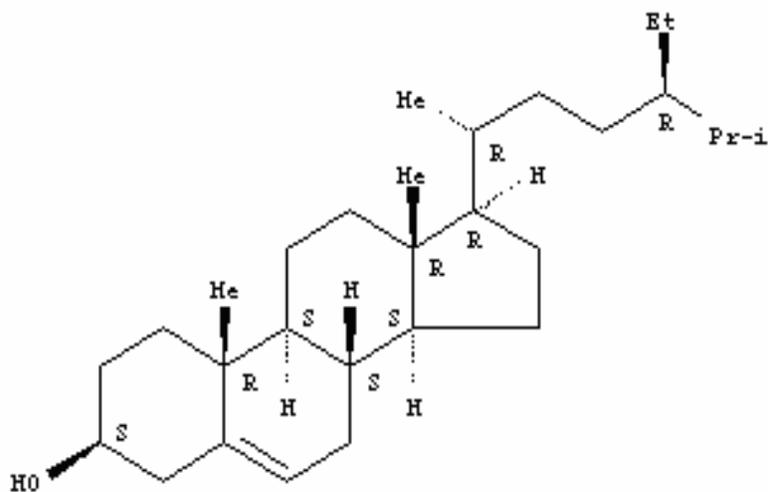


Figura 2. Estrutura química do β -sitosterol.

O estigmasta-3,5-dieno é produzido juntamente com quantias menores do isômero 2,4 e ambas substâncias originam picos únicos na cromatografia gasosa, quando a fração de hidrocarbonetos é analisada em coluna com baixa polaridade. Além disso, a soma destes dois isômeros pode ser facilmente quantificada através de análises da fração de hidrocarboneto esteróide através da cromatografia em fase gasosa (DOBARGANES; CERT; DIEFFENBACHER, 1999).

Devido à ausência do estigmastadieno em azeites de oliva virgem, desenvolveu-se este método analítico que, nos casos mais desfavoráveis,

permite detectar a presença de óleos vegetais refinados ou de azeite de oliva refinado no azeite de oliva virgem em proporções de 1% ou menos, quando a mescla com azeite refinado contiver menor conteúdo de estigmastadieno (4 mg/kg). Tendo-se avaliado 15 amostras com misturas de azeite refinado contendo 45 mg/kg de estigmastadieno, pode-se dizer que é possível detectar a presença de azeite refinado em concentrações muito mais baixas, atingindo valores próximos a 0,1% (LANZÓN; CERT, ALBI, 1989).

O azeite de oliva virgem, produzido pelo processo convencional (prensagem e centrifugação), não produz quantidade considerável de estigmastadienos (< 0,01 mg/kg), base para o limite máximo de 0,15 mg/kg na Legislação europeia. Em resíduo de óleo bruto de oliva são encontradas pequenas concentrações de estigmastadienos (entre 0,2 e 3 mg/kg), devido à aplicação de alta temperatura durante o processo de secagem do azeite de oliva (DOBARGANES; CERT; DIEFFENBACHER, 1999).

Dependendo das condições aplicadas durante o processo de refino, o azeite de oliva refinado comercial revela concentrações de estigmastadienos entre 2 e 100 mg/kg (LANZÓN; CERT, ALBI, 1989).

Cert e outros (1994), para verificar o processo industrial, submeteram duas amostras de azeite de oliva contendo 50 mg/kg de estigmastadieno à desodorização em planta industrial a 245°C durante 5 horas, utilizando-se vapor e gás nitrogênio. Como resultado, o teor de estigmastadieno diminuiu para 34 e 24 mg/kg, respectivamente, sugerindo a remoção do estigmastadieno por destilação.

Ranalli, Mattia e Ferrante (1997) e Ranalli, Sgaramella e Surricchio (1999) propuseram a quantificação de estigmastadienos segundo a Resolução da União Europeia, e concluíram que este hidrocarboneto esteróide não estava presente nas amostras de azeite de oliva virgem analisadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matérias Primas

Foram adquiridas no mercado brasileiro, durante o primeiro semestre de 2006, vinte e oito (28) amostras de azeites de oliva extra virgem e duas (2) amostras de azeites de oliva virgem. Para todas as amostras, adquiriram-se duas embalagens de cada lote.

Quanto à origem, 10 amostras foram oriundas de Portugal, 8 da Espanha, 5 da Itália, 3 da Grécia, 3 da Argentina e apenas uma amostra do Líbano. Das 30 amostras analisadas, apenas 3 não foram envasadas em seu país de origem.

As Tabelas 14 e 15 mostram as informações já citadas e também incluem a acidez declarada nos rótulos dos azeites e a empresa responsável pela importação e distribuição dessas amostras no Brasil.

Outras amostras de óleos refinados, tais como soja, girassol e canola, foram adquiridas e analisadas quanto ao perfil cromatográfico, para fins de pesquisa de adulteração.

Como pode ser observado, excluiu-se o nome comercial das amostras de azeite, sendo estes substituídos por codificação através de letras. Apenas uma marca possui codificação por letra e número; isto para diferenciar as categorias dos azeites: o número 1 representa a amostra extra virgem e o 2, a amostra de azeite virgem. As duas amostras de azeite virgem estão codificadas com as letras **K** e **O2**.

Tabela 14. Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Extra Virgem.

AMOSTRA	ACIDEZ DECLARADA	PAÍS ORIGEM	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/ DISTRIBUIDOR
A	até 0,7%	Portugal	Origem	Rabaçal Aragão Imp. Exp. e Com. Ltda
B	até 0,8%	Espanha	Brasil (Euro Comércio)	Euro Comércio Exterior Ltda
C	até 0,5%	Portugal	Origem	Bunge Alimentos S.A.
D	até 1%	Argentina	Origem	Unilever Bestfoods Brasil Ltda
E	até 0,5%	Portugal	Origem	Lazeite Brasil Ltda.
F	até 0,5%	Espanha	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
G	até 0,5%	Itália	Origem	Tirreno Ind. Com. Imp. E Exp. Ltda
H	até 0,8%	Itália	Origem	Ferrero do Brasil Ind. Ltda
I	até 0,5%	Espanha	Origem	Interfood Importação Ltda
J	até 0,8%	Portugal	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
L	até 1%	Argentina	Origem	ADM do Brasil Ltda.
M	até 0,5%	Itália	Origem	Cadal Imp. Exp. Rep. Ltda
N	até 0,5%	Espanha	Origem	Bunge Alimentos S.A.
P	até 1%	Portugal	Brasil (Olima)	Olima Ind. de Alimentos Ltda
Q	até 1%	Portugal	Origem	Cargill Agrícola S.A.
O1	até 0,7%	Portugal	Origem	Qualimpor Imp. Exp. Prod. Alim. Ltda
R	até 0,75%	Espanha	Origem	Cargill Agrícola S.A.
S	-	Espanha	Origem	La Pastina Imp. Exp. Ltda.
T	até 0,8%	Espanha	Origem	Importadora de Frutas La Violetera Ltda
U	até 0,7%	Portugal	Origem	Paladar Comércio Ltda
V	até 1%	Líbano	Brasil (Maxifour)	Maxifour Prod. Alimentícios Ltda
W	até 0,8%	Grécia	Origem	Golfinho Imp. Exp. Ltda.
X	até 0,6%	Itália	Origem	Colavita Brasil Coml. Imp. E Exp. Ltda
Y	até 0,5%	Grécia	Origem	High Tech Imp. e Exp. Ltda
Z	até 0,8%	Itália	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
Aa	até 0,8%	Grécia	Origem	Carrefour Com. e Ind. Ltda
Bb	-	Argentina	Origem	Stela Mar Ind. Com. Imp. Ltda
Cc	até 0,7%	Espanha	Origem	Mr. Man-Mad Product Dist. Ltda

(-) Dados não declarados na embalagem do produto.

Tabela 15. Dados retirados dos rótulos de Azeites de Oliva Virgem.

AMOSTRA	ACIDEZ DECLARADA	PAÍS ORIGEM	LOCAL DE ENVASE	IMPORTADOR/ DISTRIBUIDOR
K	até 1,5%	Portugal	Origem	Rabaçal Aragão Imp. Exp. e Com. Ltda
O2	até 1,5%	Portugal	Origem	Qualimpor Imp. Exp. Prod. Alim. Ltda

(-) Dados não declarados na embalagem do produto.

3.2. Métodos

Todos os métodos selecionados foram testados com uma única amostra de azeite extra virgem. Após o domínio das técnicas, estas foram aplicadas a todas as amostras. Os métodos utilizados foram os critérios de qualidade (exceto avaliação organoléptica) e os critérios de pureza (exceto eritrodíol+uvaol e ceras).

A relação completa dos critérios de qualidade para azeites de oliva extra virgem e virgem e seus limites de detecção encontram-se nos Quadros 1 e 2, respectivamente, apresentados no final do item 3.2.1, e os critérios de pureza de ambos azeites, no Quadro 3, que podem ser visualizados no final do item 3.2.2.

3.2.1. Critérios de Qualidade

Os critérios de qualidade foram realizados segundo a metodologia apresentada pelo Diário Oficial de la Unión Europea (2003). Somente as determinações de ácidos graxos livres e índice de peróxido seguiram a metodologia da AOCS (2004).

A Tabela 16 mostra os limites máximos permitidos dos critérios de qualidade para os azeites: oliva extra virgem, oliva virgem, oliva lampante, oliva refinado e oliva (virgem+refinado), segundo a Resolução da Unión Europea (2003).

Tabela 16. Limites máximos permitidos para os critérios de qualidade.

AZEITE	ACIDEZ	ÍNDICE DE PERÓXIDOS	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
Oliva Extra Virgem	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Oliva Virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Oliva (virgem+refinado)	≤ 1,0	≤ 15	—	≤ 0,90	≤ 0,15
Oliva Refinado	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 1,10	≤ 0,16
Bagaço de Oliva Refinado	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 2,00	≤ 0,20

FONTE: UNIÓN EUROPEA (2003).

3.2.1.1. Análises Físico-Químicas

Para a determinação dos índices gerais de qualidade de azeite de oliva extra virgem e virgem, foram realizadas duas análises físico-químicas: ácidos graxos livres e índice de peróxido, segundo a metodologia da AOCS, Ca 5a-40 e Cd 8b-90, respectivamente (AOCS, 2004). Os resultados do grau de acidez foram expressos em porcentagem de ácido oléico (%) e o índice de peróxido em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de azeite (mEq O₂/ kg).

3.2.1.2. Determinação do Coeficiente de Extinção Específica

A determinação do coeficiente de extinção específica foi realizada de acordo com a metodologia descrita no Anexo IX do Diário Oficial de la Unión Europea (2003).

As medições das soluções ocorreram nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de espessura e tendo-se o isooctano como referência. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/ Visível Perkin Elmer – Lambda 20.

O procedimento experimental, descrito nesta metodologia, sugere que as amostras de azeite de oliva sejam dissolvidas em isooctano na concentração de 0,01%. No entanto, esta concentração deve ser testada e adaptada de acordo com o tipo de azeite, uma vez que o limite de sensibilidade do espectrofotômetro situa-se entre as leituras de absorbância, ou densidade óptica, de 0,2 a 0,8%. Na determinação da extinção específica é necessário averiguar os limites de concentração que obedecem a Lei de Lambert-Beer, nos comprimentos de onda em que se deseja trabalhar (GRACIAN, 1968).

Para as medidas a 270 nm esta Lei é obedecida em uma ampla faixa de concentração, no caso do azeite refinado, e para o azeite virgem o

comportamento é mais satisfatório para valores acima de 2% de concentração do azeite (AUED-PIMENTEL, 1991). Por outro lado, os limites de validade para as medidas a 232 nm são muito estreitos e dificilmente atingem a 1% para azeites virgens (GRACIAN, 1968). As leituras da extinção específica neste comprimento de onda normalmente são feitas com soluções a 0,2% e o valor obtido multiplicado por cinco para extrapolá-lo para solução a 1% (AUED-PIMENTEL, 1991).

No caso de extinção específica com alumina, as leituras foram realizadas após a passagem da matéria graxa pela coluna de alumina, previamente tratada em mufla a 380 – 400°C durante 3 horas e posterior umidificação do adsorvente com 5% de água destilada.

A partir dos valores obtidos, calcularam-se as extinções específicas nos diversos comprimentos de onda, através da fórmula apresentada a seguir:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot e}$$

onde: K_{λ} \Rightarrow extinção específica no comprimento de onda lambda;

E_{λ} \Rightarrow extinção medida no comprimento de onda lambda;

c \Rightarrow concentração do solvente em g por 100 mL;

e \Rightarrow espessura da cubeta em cm.

Segundo a legislação, os resultados devem ser expressos com, no mínimo, duas casas decimais. O valor de ΔK foi calculado através da fórmula:

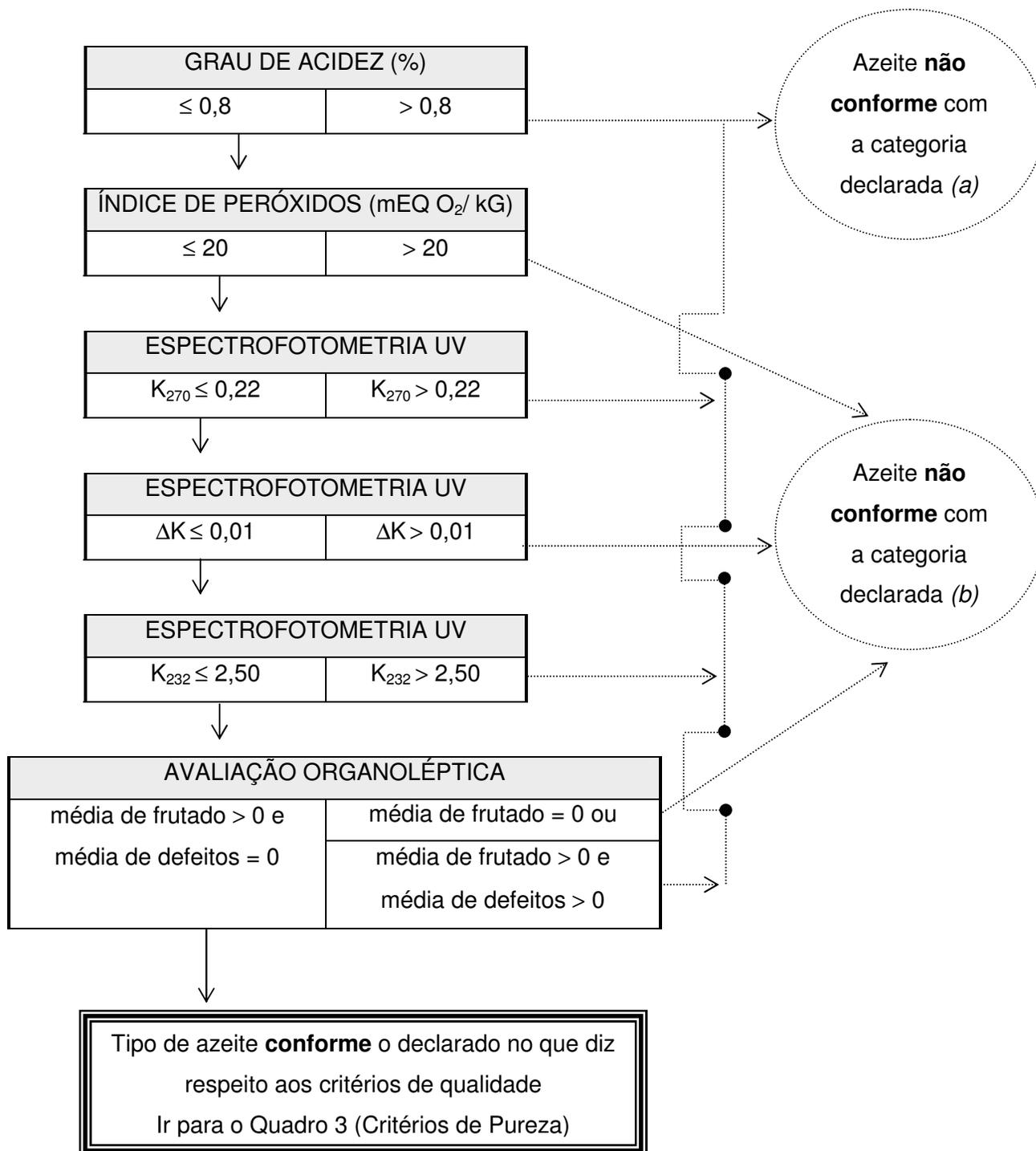
$$\Delta K = K_m - [(K_{m-4} + K_{m+4})/2]$$

onde: K_m \Rightarrow extinção específica no comprimento de onda m, sendo o comprimento de onda de máxima absorção de aproximadamente 270 nm.

K_{m-4} \Rightarrow extinção específica no comprimento de onda 266 nm.

K_{m+4} \Rightarrow extinção específica no comprimento de onda 274 nm.

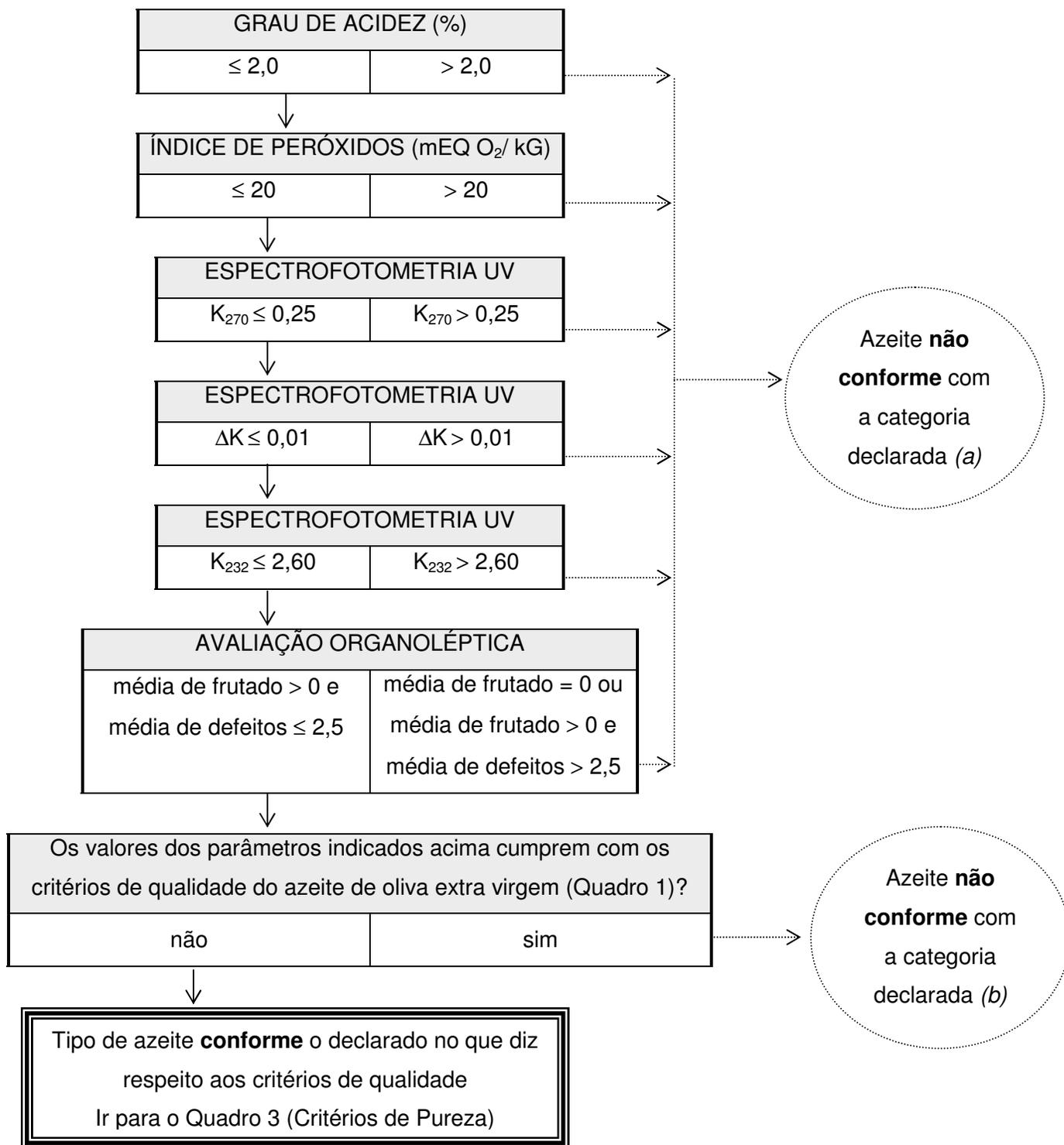
Quadro 1. Critérios de qualidade para azeite de oliva extra virgem.



(a) Pode ser azeite de oliva virgem ou lampante.

(b) Pode ser azeite de oliva lampante.

Quadro 2. Critérios de qualidade para azeite de oliva virgem.



(a) Pode ser azeite de oliva lampante.

(b) Pode ser azeite de oliva extra virgem.

3.2.2. Critérios de Pureza

Os critérios de pureza selecionados foram realizados segundo a metodologia apresentada pelo Diário Oficial de la Unión Europea (2003). No entanto, a determinação de esteróis foi modificada segundo BECKER (2004).

3.2.2.1. Composição em Ácidos Graxos

A composição em ácidos graxos foi realizada mediante o preparo de ésteres metílicos utilizando reagente de esterificação proposto por Hartman & Lago (1973), modificado por Maia (1992), em substituição ao BF₃. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia em fase gasosa em equipamento marca CGC Agilent 6850 Series GC System com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent, com fases estacionárias polares (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, nas dimensões: 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. O fluxo da coluna foi de 1,0 mL/ min., a velocidade linear de 24 cm/ seg, o gás de arraste foi o hélio, o volume de injeção de 1,0 µL e split 1:50. A temperatura do detector foi programada a 280°C, do injetor a 250°C e o forno foi regulado a 110°C por 5 min, 110-215°C (5°C/ min) e 215°C por 24 min, totalizando 50 minutos de corrida.

A identificação dos picos foi feita pelo tempo de retenção através da co-cromatografia utilizando padrões puros dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. A quantificação foi feita por normalização de área. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. Além disso, com esta coluna capilar, foi possível separar com precisão diferentes isômeros *trans*, que poderiam estar presentes nas amostras de azeite de oliva.

3.2.2.2. Índice de Iodo e Saponificação Calculados

Após a caracterização dos azeites de oliva através da composição em ácidos graxos, calculou-se o índice de iodo e saponificação para todas as amostras analisadas.

O índice de iodo é uma medida 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, utilizou-se a fórmula teórica obtida da estequiometria da reação de iodo com os ácidos graxos insaturados (BECKER, 2004).

3.2.2.3. Determinação da Diferença do ECN 42 Experimental e Teórico

A determinação da composição triacilglicerólica foi realizada segundo a metodologia descrita no Anexo XVIII do Diário Oficial de la Unión Europea (2003).

A adulteração do azeite de oliva com óleos de sementes oleaginosas (milho, algodão, palma, soja e girassol), presentes em baixo teor no azeite, pode ser verificada pela detecção do aumento dos níveis de trilinoleína (triacilglicerol LLL – pertencente ao grupo ECN42), geralmente ausentes ou presentes em níveis muito baixos (<0,5%) no azeite de oliva.

O método para se determinar a composição teórica de triacilgliceróis por ECN 42 e sua diferença em relação aos dados obtidos através de análise por HPLC consiste, essencialmente, em ajustar os dados analíticos obtidos por outros métodos. Este procedimento ocorre em três fases distintas: determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa em coluna

capilar, cálculo da composição teórica de triacilgliceróis por ECN 42 e determinação triacilglicerólica por ECN 42 através de análise por HPLC.

A determinação triacilglicerólica por ECN 42 seguiu a metodologia descrita por Facioli e Gonçalves (1998). Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), marca Perkin Elmer 250, tendo-se como detector o índice de refração, marca Waters, modelo 2414, coluna Luna C18, fase reversa, 5 micras, 100 Å, 250 x 4,6 mm, referência 00G-4041-E0, marca Phenomenex e coluna de guarda Securityguard Cartridges Holder, referência KJ0-4282, marca Phenomenex. A fase móvel usada foi acetona/ acetonitrila (62:38), com fluxo de 1 mL/ min e temperatura da coluna de 40°C. A amostra foi preparada na concentração de 3% em acetona e o volume injetado foi de 20 µL.

Utilizou-se o software Peak Simple versão 2.83, fabricante SRI Instruments para o cálculo da composição triacilglicerólica, que foi realizado através do método de normalização interna, ou seja, considerou-se a soma das superfícies dos picos distintos, correspondente aos triacilgliceróis de ECN entre 42 e 52, sendo igual a 100%. Calculou-se, então, a porcentagem relativa a cada triacilglicerídeo através da fórmula seguinte:

$$\% \text{ de triacilglicerídeo} = \frac{\text{superfície do pico} \times 100}{\text{soma das superfícies dos picos}}$$

O resultado foi expresso com quatro casas decimais.

O cálculo da composição triacilglicerólica foi realizado através dos dados obtidos de composição em ácidos graxos. Foram colocados em um programa computacional segundo Cortesi, Rovellini e Fedeli (1990), para se prever a composição triacilglicerólica de ECN 42 segundo a distribuição 1,3-random, 2-random.

A Tabela 17 mostra os limites máximos permitidos por Legislação para a diferença entre ECN 42 por HPLC e ECN 42 teórico (Δ ECN 42).

Tabela 17. Limites máximos permitidos para a análise de Δ ECN 42

AZEITE	Δ ECN 42
Oliva Extra Virgem	$\leq 0,2$
Oliva Virgem	$\leq 0,2$
Oliva (virgem+refinado)	$\leq 0,3$
Oliva Refinado	$\leq 0,3$
Bagaço de Oliva Refinado	$\leq 0,5$

FONTE: UNIÓN EUROPEA (2003).

3.2.2.4. Quantificação de Estigmastadienos

A quantificação de estigmastadienos foi realizada segundo a metodologia descrita no Anexo XVII do Diário Oficial de la Unión Europea (2003), equivalente ao método Cd 26-96 da AOCS (2004).

A quantificação de estigmastadienos foi realizada a partir da obtenção da matéria insaponificável do azeite de oliva e subsequente separação da fração de hidrocarbonetos esteróides por cromatografia em coluna aberta. O resíduo seco obtido foi mantido em pequena quantidade de hexano e posteriormente submetido à análise por cromatografia em fase gasosa. A metodologia é descrita em detalhes, pois a fonte utilizada é de difícil acesso, além de que este é o objetivo principal deste trabalho.

a) Obtenção da Matéria Insaponificável

A matéria insaponificável foi obtida da seguinte maneira:

- Pesou-se 20 g \pm 100 mg da amostra homogeneizada em um balão de fundo redondo de 250 mL;
- Adicionou-se 1 mL de solução de colest-3,5-dieno na concentração de 20 mg/kg (PI) e 75 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 10 %;
- A saponificação aconteceu sob refluxo à temperatura de ebulição, com aquecimento durante 1 hora após o início da condensação;
- Resfriou-se o sistema adicionando, pelo condensador, 100 mL de água destilada fria;

A Figura 3 ilustra a saponificação do azeite de oliva.



Figura 3. Saponificação da amostra sob refluxo.

- Após resfriamento à temperatura ambiente, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de decantação de 500 mL, e o balão foi lavado com o auxílio de 100 mL de hexano (PE 65-70°C);
- A extração da matéria insaponificável procedeu-se mediante a agitação vigorosa da mistura durante 30 segundos (para permitir a formação do sabão e a separação da matéria insaponificável);
- Após a separação da fase orgânica (superior) da fase aquosa (inferior), recolheu-se a fração de hexano em outro funil de separação;
- Deixou-se em repouso até que se completasse a decantação (se houvesse produção de emulsão que persistisse a desaparecer, adicionava-se pequenas quantidades de etanol);
- Transferiu-se a fase aquosa (inferior) para um segundo funil de decantação e extraiu-se novamente com mais 100 mL de hexano;
- Escoou-se novamente a fase aquosa (inferior) e lavou-se (combinando com outro funil de separação) com três porções de 100 mL de cada vez da mistura água/etanol 96 v/v (1:1) até que se obtivesse pH neutro;
- Filtrou-se a solução lavada através de um funil contendo 50 g de sulfato de sódio anidro e, em seguida, lavou-se o papel com 20 mL de hexano;
- Evaporou-se o solvente em rotaevaporador a 30°C sob pressão reduzida até o volume de aproximadamente 5 mL;
- Transferiu-se o resíduo para um balão tipo pêra, previamente seco e tarado;
- Evaporou-se completamente o solvente e secou-se em estufa a 80°C por 30 min;

- Após resfriamento à temperatura ambiente em dessecador, pesou-se o balão para a determinação do teor de matéria insaponificável da amostra, por gravimetria.

A Figura 4 mostra a matéria insaponificável obtida após a extração com hexano e secagem sob pressão reduzida.



Figura 4. Matéria insaponificável após secagem da amostra.

b) Separação da Fração de Hidrocarbonetos Esteróides

A separação da fração esterólica procedeu-se da seguinte maneira:

- Utilizou-se uma coluna de fracionamento composta de vidro e provida de torneira de teflon e anel de vidro em seu fundo, com 1,5 cm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento;

- Para o preparo da coluna de sílica gel, utilizaram-se 15 g de sílica e 40 mL de hexano. Após a sedimentação desta solução, acrescentou-se 3 g de sulfato de sódio anidro até uma altura de 0,5 cm da coluna acima descrita;

- Introduziu-se o resíduo resultante da evaporação (item a) na coluna de fracionamento com ajuda de duas porções de 1 mL cada de hexano e iniciou-se a eluição cromatográfica com hexano a um fluxo aproximado de 1 mL/min;
- Descartou-se os 20 mL iniciais do eluído (fração 1 – hidrocarbonetos saturados) e recolheu-se os 60 mL seguintes (fração 2 – hidrocarbonetos esteróides) em uma proveta;

A Figura 5 apresenta a ilustração de eluição de matéria insaponificável em coluna aberta.



Figura 5. Eluição de amostra por cromatografia em coluna aberta.

- Evaporou-se a fração 2 em rotaevaporador a 30°C sob pressão reduzida até a secagem completa da amostra;
- Dissolveu-se imediatamente este resíduo seco em 0,5 mL de hexano grau HPLC e analisou-se a fração por cromatografia em fase gasosa.

c) Cromatografia em Fase Gasosa

Utilizou-se o cromatógrafo gasoso, marca CGC Agilent 6850 Series GC System com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano), nas dimensões: 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura filme. O fluxo da coluna foi de 1,0 mL/ min., a velocidade linear de 24 cm/ seg, o gás de arraste foi o hélio, o volume de injeção de 1,0 µL e split 1:15. A temperatura do detector foi programada a 320°C, do injetor a 300°C e o forno foi regulado a 235°C por 6 min, 235-285°C (2°C/ min) e 285°C por 14 min, totalizando 45 minutos de corrida.

d) Identificação de Picos no Cromatograma

De acordo com a Resolução da União Europeia (2003), o pico do padrão interno (colesta-3,5-dieno) elui em um tempo de retenção de aproximadamente 19 minutos e o pico do estigmasta-3,5-dieno elui com um tempo de retenção de aproximadamente 1,29 minuto após o pico do padrão.

Os picos do estigmastadieno no cromatograma podem vir acompanhados de pequenas quantidades de um isômero que, em geral, originam um só pico cromatográfico. Se a coluna do cromatógrafo for demasiadamente polar, tem-se um grande poder de resolução, e o isômero pode aparecer em forma de um pequeno pico pouco antes do pico do estigmasta-3,5-dieno. Em outros casos, é necessário somar as áreas dos dois picos. Para se realizar uma técnica

segura, foi necessária a utilização de uma coluna de baixa polaridade e de maior diâmetro interno.

e) Análise Quantitativa

O conteúdo de estigmastadieno foi determinado aplicando-se a fórmula:

$$\text{mg / kg de estigmastadienos} = \frac{(As \times Mc)}{(Ac \times Mo)}$$

onde: As \Rightarrow área de pico de estigmastadieno (se houver pico duplo deve-se somar suas áreas);

Ac \Rightarrow área de pico do padrão interno (colestadieno);

Mc \Rightarrow peso do padrão adicionado, em microgramas;

Mo \Rightarrow peso da amostra analisada, em gramas.

A Tabela 18 apresenta os limites máximos permitidos por Legislação para a análise de estigmastadieno.

Tabela 18. Limites máximos permitidos para a análise de estigmastadieno

AZEITE	ESTIGMASTADIENO (mg/kg)
Oliva extra virgem	$\leq 0,15$
Oliva virgem	$\leq 0,15$
Oliva (virgem+refinado)	—
Oliva refinado	—
Bagaço de Oliva Refinado	—

FONTE: UNIÓN EUROPEA (2003).

3.2.2.5. Quantificação de Esteróis

A quantificação de esteróis foi realizada de acordo com a metodologia adaptada por BECKER (2004).

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 a saponificação do azeite, extração da matéria insaponificável com éter etílico, lavagem do extrato com água, fracionamento da matéria insaponificável por cromatografia de camada delgada (TLC), 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).

Na quantificação de esteróis proposta por BECKER (2004), algumas das etapas do procedimento tradicional foram suprimidas, tais como: lavagem da matéria insaponificável com água, tratamento das placas preparativas com solução alcalina e derivatização da fração esterólica. No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada no resultado final de identificação e quantificação de esteróis.

Como padrões cromatográficos utilizou-se o β -sitosterol (60% de pureza, Sigma S-5753), campesterol (Sigma C-5157), estigmasterol (Fluka 85860), colesterol (5-cholesten-3 β -ol, 99% de pureza, Sigma C-8667) e como padrão interno o diidrocolesterol (5 α -cholestan-3 β -ol, 95-97% de pureza, Sigma D-6128). Para a confecção das cromatoplasmas de vidro preparativas de 20x20 cm foi utilizada sílica gel 60 (Merck), além da solução etanólica de 2,7-diclorofluoresceína a 0,2% como revelador e cabine com lâmpada ultravioleta a 365 nm ("Original Hanau" 220V, 50 Hz, 85W) para visualização dos componentes da matéria insaponificável.

Os esteróis foram analisados por cromatografia em fase gasosa, equipamento marca CGC Agilent 6850 Series GC System, separados em coluna capilar de sílica fundida HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano), nas dimensões: 60 m de comprimento, 0,253 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura filme. O fluxo da coluna foi de 1,0 mL/ min., a velocidade linear de 24 cm/ seg, o gás de arraste foi o hélio, o volume de injeção de 1,0 µL e split 1:50. A temperatura do detector foi programada a 325°C, do injetor a 325°C e o forno foi regulado a 310°C, uma isoterma que totalizou 30 minutos de corrida.

A Tabela 19 apresenta os limites permitidos por Legislação para os principais esteróis, presentes no azeite de oliva: colesterol, campesterol, estigmasterol, β-sitosterol e esteróis totais.

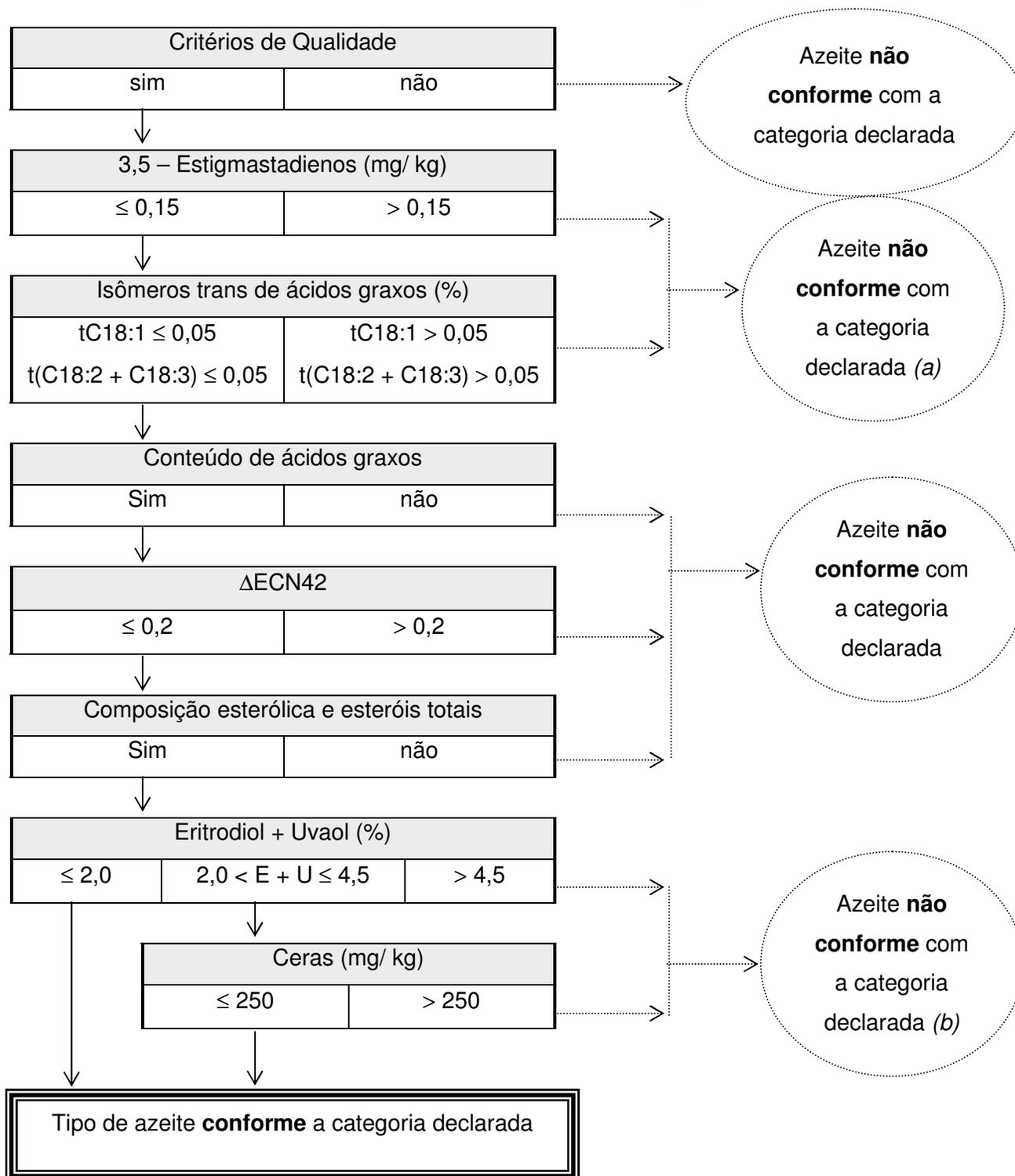
Tabela 19. Limites permitidos por Legislação para a análise de esteróis.

AZEITE	COLESTEROL	CAMPESTEROL	ESTIGMASTEROL	β-SITOSTEROL (1)	ESTERÓIS TOTAIS
Oliva Extra Virgem	≤ 0,5	≤ 4,0	< campesterol	≥ 93,0	≥ 1000
Oliva Virgem	≤ 0,5	≤ 4,0	< campesterol	≥ 93,0	≥ 1000
Oliva (virgem + refinado)	≤ 0,5	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≥ 1000
Oliva Refinado	≤ 0,5	≤ 4,0	< campesterol	≥ 93,0	≥ 1000
Bagaço de Oliva	≤ 0,5	≤ 4,0	< campesterol	≥ 93,0	≥ 1800

(1) Δ5,23-estigmastadienol + clerosterol + sitosterol + sitostanol + Δ5-avenasterol + Δ5,24-estigmastadienol

FONTE: UNIÓN EUROPEA (2003).

Quadro 3. Critérios de pureza para azeite de oliva extra virgem e virgem.



(a) Presença de azeite refinado (de oliva ou outros).

(b) Presença de bagaço de oliva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Critérios de Qualidade

Inicialmente, os azeites foram avaliados quanto aos critérios de qualidade. Realizaram-se as análises de ácidos graxos livres (expressa em ácido oléico), índice de peróxido, extinção específica nos comprimentos de onda de 232nm e 270 nm com e sem alumina e variação ΔK .

4.1.1. Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas consistem na determinação de ácidos graxos livres e índice de peróxido. Estas análises iniciais são fundamentais para se obter a caracterização dos azeites de oliva estudados. Neste momento, os resultados poderão prever as condições em que os azeites foram produzidos e armazenados.

De acordo com Cimato (1990), a extração do azeite e sua posterior conservação dão origem a alguns processos de degradação extra e intracelular, causadores de duas importantes alterações no azeite de oliva: acidificação e rancificação. Estas alterações podem ser produzidas mediante a hidrólise, com a conseqüente liberação de ácidos livres, detectável como a acidez e, por outro lado, mediante a autooxidação enzimática, dando origem a peróxidos que se transformam em produtos de degradação muito reativos.

Sabe-se, ainda, que o aumento da acidez livre é uma conseqüência, principalmente, da atividade enzimática causada por avarias na azeitona (BOSCOU, 1996). Alba, Izquierdo e Gutiérrez (1997) apontam outros diversos fatores que podem afetar o grau de acidez: cultivo, variedade da azeitona, tipo de colheita, mescla de azeitonas (solo e árvores), tipo e tempo de armazenamento das azeitonas, condição de elaboração, entre outros.

Estas análises apresentaram coeficiente de variação (CV) menor que 3% para ácidos graxos livres (AGL) e menor que 7% para índice de peróxido. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20. Critérios de Qualidade para os Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem.

AMOSTRA	ACIDEZ (%)	IND. PERÓXIDO (mEQ O ₂ / kg)
A	0,68	12,13
B	0,41	<u>18,16</u>
C	0,28	7,85
D	<u>0,81</u>	<u>16,05</u>
E	0,16	11,07
F	0,32	11,77
G	<u>0,28</u>	<u>1,56</u>
H	0,47	<u>17,40</u>
I	0,39	7,91
J	0,27	<u>17,56</u>
K	1,13	13,18
L	0,61	<u>25,58</u>
M	0,43	13,23
N	0,29	12,29
O1	0,45	7,40
O2	<u>0,31</u>	<u>16,80</u>
P	0,70	12,94
Q	0,32	11,97
R	0,38	10,90
S	0,64	4,28
T	0,61	11,86
U	<u>0,82</u>	13,18
V	<u>1,40</u>	9,21
W	0,54	<u>16,41</u>
X	<u>0,83</u>	<u>21,38</u>
Y	0,53	<u>18,58</u>
Z	0,75	<u>20,08</u>
Aa	0,51	12,93
Bb	<u>1,61</u>	8,76
Cc	0,37	<u>15,55</u>

Sublinhado: valores dentro do limite permitido, mas já considerados altos.

Sublinhado e negrito: valores acima do limite máximo estabelecido.

Segundo a Resolução RDC nº 270 da ANVISA, vigente desde 22 de setembro de 2005, a Resolução da União Europeia (2003) e também o Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), o azeite de oliva extra virgem deve apresentar acidez máxima de 0,8g/ 100g (em ácido oléico). O azeite de oliva virgem, por sua vez, não pode ultrapassar o valor de 2,0g/ 100g (em ácido oléico).

Para o azeite de oliva refinado, o limite máximo permitido é de 0,3g/ 100g, o que significa dizer que uma possível adição de azeite de oliva refinado ao azeite de oliva extra virgem, não pode nem ser suspeitada através da análise de ácidos graxos livres. Por outro lado, uma baixa acidez para um azeite de oliva virgem, poderia levantar alguma suspeita quanto à adulteração daquele azeite.

Analisando-se a Tabela 20, pode-se perceber que 5 azeites apresentaram valores de ácidos graxos livres acima do permitido pela Legislação. Destes, os que apresentam valores mais críticos são os azeites **V** e **Bb**, pois extrapolam o limite máximo em 75% e 100%, respectivamente. Os azeites **D**, **U** e **X**, por sua vez, também apresentam valores acima do limite; no entanto, são valores aceitáveis, pois estão dentro de uma faixa de erro experimental aceitável.

Deve-se lembrar que o azeite **K** possui um valor relativamente elevado, mas dentro do limite permitido e absolutamente esperado, já que este é um azeite de oliva virgem. Já o azeite **O2**, também virgem, apresentou uma acidez muito baixa; embora dentro do limite estabelecido, este valor pode sugerir adulteração com azeite de oliva refinado. No entanto, tal hipótese só pode ser afirmada após a realização de análises mais específicas.

Com relação à análise de índice de peróxido, de acordo com a mesma Resolução da ANVISA, RDC nº 270, os valores estabelecidos para óleos prensados a frio e não refinados é de no máximo 15 mEq/ kg, e para azeite de

oliva virgem, máximo de 20 mEq/ kg. No entanto, segundo a Resolução da União Europeia (2003) e também o Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), o limite máximo permitido para o índice de peróxido, tanto para o azeite de oliva extra virgem como para o azeite de oliva virgem, é de 20 mEq O₂/ kg. Para o azeite refinado, todas as Legislações citadas regulamentam um valor no máximo de 5 mEq O₂/ kg.

O índice de peróxido apresentou 3 valores superiores ao valor máximo permitido pelas Legislações internacionais. A amostra **L** apresentou o resultado do índice de peróxido 25% acima do limite, o que evidencia uma alta oxidação deste azeite. Por outro lado, as amostras **X** e **Z** ficaram muito perto do valor máximo permitido, extrapolando o limite em apenas 0,05% para a primeira amostra e ficando dentro da faixa de erro experimental para a segunda amostra.

É importante ressaltar, neste momento, o comportamento apresentado pela amostra **G**. Os resultados obtidos, tanto para a análise de ácidos graxos livres como para o índice de peróxido, mostraram algumas características particulares para este azeite. O resultado apresentado para AGL (Tabela 20) foi muito baixo e, para o índice de peróxido, extremamente baixo. Somando-se estas duas possíveis evidências e, ainda, recorrendo-se as Legislações já citadas, pode-se, já neste momento, suspeitar-se tratar de adulteração desta amostra com azeite de oliva refinado.

4.1.2. Coeficiente de Extinção Específica

4.1.2.1. Estudos Preliminares

Como já citado anteriormente, na determinação da extinção específica é necessário estudar os limites de concentração que obedecem a Lei de Lambert-Beer, nos comprimentos de onda em que se deseja trabalhar, 232 e 270 nm.

Desta maneira, na fase inicial das análises, testou-se, com uma amostra de azeite extra virgem, as concentrações ideais (para cada comprimento de onda) que atendessem a Lei de Lambert-Beer. Neste teste preliminar, foram testadas diversas soluções, em concentrações diferentes. Após esta avaliação, definiram-se as concentrações que seriam utilizadas na análise de extinção específica. Para as leituras realizadas a 232 nm sem alumina adotou-se a concentração de 0,0016% (p/v), e para as análises a 232 nm com alumina a concentração de 0,0032% (p/v) foi a mais adequada. As concentrações a 270 nm, por sua vez, foram superiores, como já era previsto; para as análises a 270 nm sem alumina adotou-se 0,026% (p/v) e para as leituras de 270 nm com alumina, a concentração de 0,06% (p/v).

4.1.2.2. Procedimento Experimental

A avaliação espectrofotométrica do azeite de oliva no ultravioleta pode fornecer informações sobre a sua identidade, seu estado de conservação e mudanças causadas por processamento (LI-CHAN, 1994).

As determinações espectrofotométricas tiveram como coeficiente de variação (CV) um valor menor que 5% para extinção específica a 232nm (com e sem alumina) e 270 nm (sem alumina), menor que 4% para extinção específica a 270nm (com alumina) e menor que 10% para a análise de ΔK . Os resultados destas avaliações podem ser visualizados na Tabela 21.

Tabela 21. Critérios de Qualidade para os Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem.

AMOSTRA	K232		K 270		ΔK
	S/ ALUMINA	C/ ALUMINA	S/ALUMINA	C/ ALUMINA	
A	<u>2,78</u>	1,55	<u>0,25</u>	0,09	<u>0,018</u>
B	<u>4,32</u>	<u>2,21</u>	<u>1,00</u>	<u>0,53</u>	<u>0,029</u>
C	<u>2,68</u>	1,34	0,18	0,06	<u>0,018</u>
D	<u>3,17</u>	1,57	0,19	0,06	<u>0,013</u>
E	<u>4,66</u>	<u>2,70</u>	<u>2,40</u>	<u>1,83</u>	<u>0,097</u>
F	<u>2,74</u>	1,34	0,18	0,06	0,004
G	<u>6,12</u>	<u>3,16</u>	<u>1,89</u>	<u>1,08</u>	<u>0,036</u>
H	<u>2,88</u>	1,43	0,20	0,06	0,003
I	<u>2,65</u>	1,27	0,21	0,08	0,010
J	<u>2,58</u>	1,28	0,19	0,05	<u>0,017</u>
K	<u>3,14</u>	1,36	0,25	0,07	0,001
L	<u>3,67</u>	1,61	<u>0,25</u>	0,08	<u>0,022</u>
M	<u>2,72</u>	1,51	0,20	0,07	0,005
N	<u>2,82</u>	1,36	0,17	0,05	0,010
O1	2,23	1,37	0,16	0,06	0,007
O2	<u>2,66</u>	1,37	0,21	0,07	<u>0,017</u>
P	<u>2,98</u>	1,56	0,20	0,07	0,009
Q	2,39	1,39	0,17	0,05	<u>0,014</u>
R	2,37	1,56	0,17	0,06	<u>0,022</u>
S	2,37	1,41	<u>0,26</u>	0,08	<u>0,036</u>
T	<u>3,30</u>	1,31	<u>0,24</u>	0,09	<u>0,018</u>
U	<u>2,70</u>	1,44	0,22	0,07	0,010
V	<u>2,96</u>	1,31	<u>0,37</u>	<u>0,11</u>	<u>0,057</u>
W	<u>2,84</u>	1,23	0,22	0,05	<u>0,012</u>
X	<u>3,09</u>	1,48	<u>0,29</u>	0,10	<u>0,042</u>
Y	<u>3,06</u>	1,31	<u>0,24</u>	0,06	0,010
Z	<u>2,65</u>	1,31	0,22	0,06	0,004
Aa	<u>3,05</u>	1,37	0,20	0,06	0,005
Bb	<u>4,03</u>	<u>1,94</u>	<u>0,76</u>	<u>0,22</u>	<u>0,065</u>
Cc	<u>2,71</u>	1,36	<u>0,27</u>	0,08	<u>0,022</u>

Sublinhado: valores dentro do limite permitido, mas já considerados altos.

Negrito e sublinhado: valores acima do limite máximo estabelecido.

Analisando-se os resultados de extinção específica, encontrados na Tabela 21, pode-se notar que alguns dos azeites estão fora dos limites estabelecidos tanto para a extinção a 232 nm e 270 nm como para a análise de variação ΔK .

Segundo a Resolução da União Europeia (2003) e o Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), a absorvância no ultravioleta a 270 nm (sem alumina) deve ser de, no máximo, 0,22 para o azeite de oliva extra virgem e 0,25 para o azeite de oliva virgem. Ainda de acordo com tais Legislações, estabeleceu-se um valor máximo para a variação ΔK de 0,01. Para a extinção específica de 232 nm (sem alumina) estabeleceu-se, pela Resolução da União Europeia (2003), que o azeite extra virgem deve apresentar um valor máximo de 2,50 e o azeite de oliva virgem, valor de 2,60.

Nenhum órgão, nacional ou internacional, estabelece parâmetros para se avaliar a extinção específica a 232 nm com alumina. Entretanto, para a extinção a 270 nm com alumina, a antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, prevê um limite máximo de 0,10. O Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003) por sua vez, estabelece o valor máximo de 0,11 para os azeites a 270 nm, após a passagem pela alumina ativada.

Para K232 sem alumina, quase todos os azeites apresentaram valores acima dos estabelecidos pela Legislação, exceto quatro deles. No entanto, estes valores devem ser cuidadosamente analisados, pois se o índice de peróxido apresentar um valor alto, conseqüentemente o valor da extinção poderá ser afetado.

De acordo com AUED-PIMENTEL (1991), nos primeiros estágios da autooxidação do azeite, a formação de hidroperóxidos e dienos conjugados levam

ao aparecimento de uma absorção máxima ao redor de 232 nm, que rapidamente aumenta atingindo valores altos de extinção específica.

Desta maneira, pode-se afirmar que 15 das amostras apresentam valores críticos, e são as seguintes: **A, B, D, E, G, K, L, P, T, V, X, Y, Aa, Bb e Cc**. Em todos os casos, o resultado de extinção específica ultrapassou o valor máximo estabelecido por Legislação, aumentando de 8% (amostra **Cc**) a 145% (amostra **G**).

Na análise de K232 com alumina, 4 azeites apresentam resultados de extinção muito alto, sugerindo, apesar de não haver parâmetros para esta análise, que tais azeites foram fraudados com algum óleo refinado ou ainda com o próprio azeite de oliva refinado. Esta suposição se justifica considerando-se que as quatro amostras apresentaram valores de K232 sem alumina ultrapassando o limite em, pelo menos, 60%.

Com relação a K270 sem alumina, 12 amostras apresentaram valores acima do estabelecido. São elas: **A, B, E, G, L, S, T, V, X, Y, Bb e Cc**. Segundo AUED-PIMENTEL (1991), os azeites virgens que sofreram aquecimento apresentam uma absorvidade máxima na região de 270 nm, devido à decomposição dos peróxidos e conseqüente presença de compostos secundários da oxidação do azeite.

A análise de extinção específica a 270 nm sem alumina é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade de azeites de oliva, mas de acordo com a antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, para se verificar a presença de óleos refinados, quando o coeficiente de extinção específica a 270 nm sem alumina exceder o limite máximo permitido pela

categoria correspondente, é necessário proceder à determinação de K270 após a passagem da amostra em coluna de alumina.

A oxidação desenvolvida nos óleos de maneira espontânea e sem intervenção de agentes externos como o calor e tratamentos industriais, afeta em primeiro lugar os ácidos graxos livres, que são mais facilmente oxidados do que aos ligados ao triacilglicerídeo. Ao passar o azeite pela coluna de alumina, tais compostos de oxidação são completamente retidos eliminando-se, assim, os compostos mais importantes na absorção no ultravioleta. Quando a oxidação atinge estágios não muito avançados e os produtos da decomposição dos hidroperóxidos são acumulados, estes são mais facilmente retidos na coluna de alumina do que os produtos de oxidação formados em estágios mais avançados.

Os resultados apresentados na Tabela 21 mostram que, de acordo com a Legislação Brasileira, 5 amostras estão acima do limite estabelecido para K270 com alumina. São as amostras: **B, E, G, V e Bb**. Estes valores detectam a adulteração com algum óleo refinado, podendo ser o azeite de oliva. Segundo Aued-Pimentel (1991), os compostos responsáveis pela alta absorção no UV, dos óleos refinados, são ácidos graxos com ligações conjugadas (trienos), ceto-ácidos insaturados, integrantes do glicerídeo, sendo que tais compostos não são retidos pela coluna de alumina, conferindo altos coeficientes de extinção específica aos óleos refinados.

Aued-Pimentel e colaboradores (2002), avaliaram a qualidade de 136 amostras de azeites em função da categoria declarada no rótulo. As medidas da absorção específica no ultravioleta, em 232 e 270 nm, foram os parâmetros utilizados nesta avaliação. Em 7 amostras (5,1%) a classificação apresentada na rotulagem não era condizente com a qualidade do produto. As rotulagens indicavam tratar-se de azeite virgem, entretanto, os valores obtidos para as

absorções no UV eram de azeites de oliva refinado misturado ao virgem, sendo este de qualidade inferior à declarada. Das 7 amostras, 3 foram envasadas no Brasil, 2 azeites envasados na Argentina, um azeite grego e uma amostra de azeite à granel, de procedência desconhecida.

A PRO TESTE – Associação Brasileira de Defesa do Consumidor também realizou um teste para avaliar a genuinidade de azeites de oliva e publicou o resultado em sua Revista, na edição de outubro de 2002. Das 15 amostras analisadas, a maioria dos produtos era importada de Portugal e da Argentina. Dentre elas, 5 apresentaram indícios de fraude, pela adição de óleo de bagaço de oliva ou de óleo vegetal de outras sementes, principalmente a soja.

Outro método proposto para melhor caracterizar os azeites de oliva baseia-se na medida da intensidade de absorção a 270 nm relativa apenas aos trienos conjugados, descontando a influência de outros cromóforos que podem formar-se por oxidação do azeite, e absorvem na região entre 260 e 280 nm. Estes compostos, apesar de possuírem uma extinção específica moderada, contribuem de maneira considerável na intensidade de absorção naquela região.

Este método foi denominado ΔK . De acordo com a Resolução da Unión Europea (2003) e o Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), o limite máximo permitido para o valor de ΔK é de 0,01.

Como pode ser visualizado na Tabela 21, 19 amostras apresentam valores acima do máximo permitido por Legislação para ΔK . No entanto, apenas nove delas podem ser consideradas críticas, são elas: **B**, **E**, **G**, **L**, **S**, **V**, **X**, **Bb** e **Cc**. Todas as amostras citadas apresentam valores acima do permitido não só para ΔK , mas também para uma ou mais das outras análises de extinção específica.

Resultados de até 0,018 não foram considerados ruins, pois, em todos os casos, os resultados para a extinção de 232 nm e 270 nm, com alumina, mas, principalmente sem alumina, apresentaram valores dentro do parâmetro estabelecido. Valores de 0,022 foram considerados ruins para azeites com outras extinções fora do limite e considerou-se uma exceção para a amostra **R**, já que esta se apresentou totalmente dentro do limite para as outras análises. Neste caso, os valores de 0,029 ou superior apresentam características muito claras de adulteração, até mesmo pelo histórico anterior destas amostras.

4.2. Critérios de Pureza

Posteriormente, analisaram-se as amostras quanto à pureza. Dentre as análises realizadas, pode-se citar: composição em ácidos graxos, teor de ácidos graxos *trans*, índice de iodo e saponificação calculado, teor de mono e poliinsaturados, diferença do ECN42 experimental e teórico, estigmastadieno e esteróis.

4.2.1. Composição em Ácidos Graxos

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 (BECKER, 2004).

Vários estudos realizados sobre a composição em ácidos graxos de azeites de oliva mostraram amplas margens e variabilidade em sua composição, o que é considerado uma relação com os fatores genéticos e ambientais durante o desenvolvimento destes frutos (KIRITSAKIS, 1992).

Outros autores relatam, também, que o estudo da composição em ácidos graxos do azeite de oliva é procedente de diferentes épocas de colheita e variedades. Desta maneira, a porcentagem graxa está diretamente relacionada a esses fatores, sendo responsáveis por mais de 70% da variabilidade encontrada. De modo geral, deve-se levar em consideração a variação percentual do conteúdo em ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico (UCEDA & HERMOSO, 1998).

A composição em ácidos graxos é tradicionalmente utilizada pela indústria de alimentos como indicativo de pureza, embora uma ampla variação de 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-RUÍZ, 2000).

O estudo do perfil de ácidos graxos é um parâmetro que tem sido utilizado em diversas situações para caracterizar os azeites de oliva, principalmente para detectar as fraudes mais grosseiras. No entanto, este parâmetro não é suficiente para assegurar a identidade dos azeites de oliva, sendo necessário, assim, a realização de outras análises complementares.

Em 2000, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), realizou um estudo com diversas marcas de azeite de oliva existentes no mercado, com o objetivo de verificar a pureza dos produtos comercializados. Avaliaram-se características como acidez, índice de peróxido, índice de iodo, índice de refração absoluto e composição em ácidos graxos. Os ensaios realizados verificaram que, das 20 amostras analisadas, 3 apresentaram resultados que indicaram a adição de outro tipo de óleo vegetal ao azeite.

Quatro anos depois, o mesmo órgão de fiscalização realizou um novo teste com azeites de oliva. Foram encontradas no mercado apenas 6 das 20 amostras analisadas em 2000, com apenas uma das que foram consideradas não conformes. No entanto, os 3 fornecedores cujas amostras foram consideradas não conformes na primeira análise foram novamente selecionados, mesmo que com outras marcas.

Em 2004, realizaram-se as mesmas análises de pureza citadas, exceto o índice de peróxido. Nesta segunda avaliação, foram avaliadas também as informações contidas nos rótulos dos produtos. Os resultados obtidos demonstraram que 5 das 13 amostras analisadas apresentaram não conformidades em ensaios que verificam a pureza do azeite, sendo 3 delas adulteradas com outro tipo de óleo. Em relação aos 3 fornecedores acima citados, houve reincidência de fraude em todos os casos, reforçando o não cumprimento dos padrões de qualidade e identidade estabelecidos na regulamentação.

Os resultados obtidos na análise de composição em ácidos graxos podem ser visualizados na Tabela 22, apresentada a seguir.

Tabela 22. Composição em Ácidos Graxos dos Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem

Amostra	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
	0,0-0,05	7,5-20,0	0,3-3,5	0,0-0,3	0,0-0,3	0,5-5,0	55,0-83,0	3,5-21,0	0,0-0,9	0,0-0,6	0,0-0,4	0,0-0,2	0,0-0,2
A	0,00	10,87	0,75	0,14	0,25	2,67	77,17	6,44	0,74	0,42	0,30	0,12	0,05
B	0,03	12,51	0,94	0,09	0,13	3,14	60,90	19,03	1,55	0,45	0,33	0,23	0,10
C	0,01	11,57	1,02	0,10	0,17	3,80	75,43	6,31	0,68	0,45	0,25	0,12	0,06
D	0,02	15,23	1,72	0,11	0,23	1,82	65,57	13,59	0,75	0,38	0,30	0,13	0,06
E	0,06	7,32	0,23	0,05	0,05	3,71	34,74	51,77	0,22	0,33	0,25	0,61	0,23
F	0,00	12,25	1,09	0,07	0,12	3,20	73,32	8,32	0,70	0,43	0,27	0,12	0,06
G	0,02	10,74	0,83	0,10	0,15	3,14	72,76	9,84	0,84	0,47	<u>0,40</u>	<u>0,20</u>	0,09
H	0,02	12,46	1,16	0,07	0,10	2,71	71,96	9,76	0,73	0,47	0,31	0,15	0,06
I	0,02	11,39	0,94	0,10	0,16	3,54	76,46	5,77	0,67	0,43	0,27	0,12	0,05
J	0,00	11,54	0,92	0,10	0,16	3,38	74,66	7,54	0,67	0,45	0,27	0,14	0,06
K	0,00	10,64	0,70	0,15	0,29	2,68	77,20	6,61	0,73	0,41	0,30	0,12	0,06
L	0,02	16,37	2,01	0,10	0,22	1,89	62,35	15,24	0,81	0,38	0,29	0,14	0,08
M	0,01	11,81	0,90	0,07	0,10	2,62	75,30	7,43	0,70	0,46	0,34	0,15	0,06
N	0,00	11,85	1,03	0,13	0,20	3,30	74,86	6,97	0,67	0,45	0,27	0,13	0,06
O1	0,00	14,49	2,06	0,10	0,26	1,80	75,15	5,18	0,62	0,22	0,16	0,00	0,00
O2	0,02	11,56	0,93	0,14	0,22	3,55	75,61	6,14	0,84	0,46	0,25	0,13	0,06
P	0,02	14,05	1,37	0,09	0,18	1,98	69,05	11,49	0,79	0,38	0,30	0,14	0,07
Q	0,00	11,44	1,02	0,05	0,11	3,67	76,38	5,79	0,69	0,41	0,25	0,11	0,06
R	0,00	11,13	0,95	0,10	0,16	3,43	76,94	5,64	0,72	0,43	0,27	0,14	0,06
S	0,00	10,38	0,96	0,05	0,08	4,26	78,30	4,37	0,73	0,45	0,25	0,11	0,05
T	0,02	16,05	1,86	0,10	0,13	2,76	62,75	14,60	0,70	0,48	0,24	0,16	0,07
U	0,05	12,46	1,55	0,08	0,20	1,91	76,46	6,16	0,67	0,24	0,18	0,05	0,00
V	0,07	11,49	0,66	0,31	0,29	4,98	68,36	11,31	0,71	0,67	0,35	0,19	0,08
W	0,02	11,57	0,85	0,05	0,07	2,84	76,51	6,22	0,72	0,52	0,32	0,18	0,07
X	0,01	11,81	0,90	0,07	0,12	3,02	74,96	7,44	0,67	0,45	0,31	0,13	0,06
Y	0,00	11,86	0,89	0,07	0,08	2,67	75,69	6,95	0,70	0,49	0,32	0,18	0,07
Z	0,00	12,08	0,88	0,09	0,14	3,15	73,76	8,14	0,67	0,48	0,31	0,13	0,07
Aa	0,02	11,19	0,87	0,06	0,08	2,85	76,23	6,89	0,70	0,49	0,30	0,16	0,07
Bb	0,03	16,80	1,99	0,14	0,20	2,23	60,69	15,95	<u>0,88</u>	0,41	0,28	0,15	0,08
Cc	0,01	10,55	0,86	0,08	0,10	3,84	78,01	5,01	0,68	0,42	0,24	0,11	0,05

Valores em negrito e sublinhado: acima do limite máximo permitido por Legislação.

De acordo com a Tabela 22, pode-se observar que a amostra **E** foi a mais grosseiramente adulterada, apresentando baixo teor de ácido oléico e alto teor de linoléico. Além disso, apresenta baixos teores de palmítico e linolênico e alto valor de behênico que, segundo Arturo Cert *, sugere adulteração com óleo de girassol normal. A Tabela 23 mostra uma comparação feita entre o azeite de oliva extra virgem, o óleo de girassol e a amostra **E**.

Tabela 23. Composição em ácidos graxos do óleo de girassol, do azeite de oliva extra virgem e da amostra **E**.

<i>Ácido Graxo</i>	<i>Óleo de Girassol</i>	<i>Oliva Extra Virgem</i>	<i>Amostra E</i>
C 14:0	0,08	—	<u>0,06</u>
C 16:0	6,22	11,44	<u>7,32</u>
C 16:1	0,10	1,02	<u>0,23</u>
C 18:0	3,45	3,67	3,71
C 18:1	26,24	76,38	<u>34,74</u>
C 18:2	62,00	5,79	<u>51,77</u>
C 18:3	0,37	0,69	<u>0,22</u>
C 20:0	0,27	0,41	0,33
C 20:1	0,19	0,25	0,25
C 22:0	0,66	0,11	<u>0,61</u>
C 24:0	0,23	0,06	<u>0,23</u>

Analisando-se a Tabela 23, pode-se perceber que, além dos baixos teores dos ácidos oléico, palmítico e linolênico, e altos teores de linoléico e behênico, a amostra **E** apresenta, ainda, valores fora do limite permitido dos ácidos graxos mirístico, palmitoléico e lignocérico. Desta maneira, pode-se dizer que todos os argumentos discutidos, e todas as suspeitas levantadas até o momento condizem com a adulteração desta amostra com óleo de girassol normal. No entanto, para se obter um estudo mais completo para este trabalho, ainda foram realizadas outras análises com a amostra **E**.

* CERT, Arturo. **Instituto de la Grasa**. Sevilla, Spain. [mensagem pessoal]

A amostra **B**, por sua vez, de acordo com a Tabela 22, apresenta alto teor de ácido linolênico o que sugere, também de acordo com Arturo Cert *, adulteração com soja ou canola. No caso de fraude com soja, o resultado é confirmado na análise de ECN42 (item 4.2.3) e, no caso de canola, confirma-se na análise de esteróis, através do teor de brassicasterol. A Tabela 24, apresentada a seguir, mostra uma comparação feita entre os óleos de soja e canola, o azeite de oliva extra virgem e a amostra **B**.

Tabela 24. Composição em ácidos graxos dos óleos de soja e de canola, do azeite de oliva extra virgem e da amostra **B**.

<i>Ácido Graxo</i>	<i>Óleo de Soja</i>	<i>Óleo de Canola</i>	<i>Oliva Extra Virgem</i>	<i>Amostra B</i>
C 14:0	0,08	—	—	0,03
C 16:0	11,14	5,34	11,44	12,51
C 16:1	0,08	0,19	1,02	0,94
C 18:0	3,48	2,59	3,67	3,14
C 18:1	22,72	61,35	76,38	60,90
C 18:2	54,28	21,67	5,79	19,03
C 18:3	5,45	6,58	0,69	<u>1,55</u>
C 20:0	0,36	0,64	0,41	0,45
C 20:1	0,22	0,99	0,25	0,33
C 22:0	0,48	0,29	0,11	<u>0,23</u>
C 24:0	—	0,18	0,06	0,10

De acordo com a Tabela 24, tanto o óleo de soja como o óleo de canola apresentam alto teor de ácido linolênico e, adotando-se simplesmente este parâmetro de avaliação, não é possível afirmar com qual destes óleos a amostra **B** é adulterada. O teor de ácido behênico também está acima do limite estabelecido, mas, da mesma maneira, não é possível prever a adulteração. Por outro lado, deve-se observar o teor de ácido palmítico apresentado pelas amostras de óleo de soja e canola; neste caso, o óleo de canola apresenta menor porcentagem de ácido palmítico, o que pode sugerir uma maior probabilidade de adulteração com o óleo de soja.

* CERT, Arturo. **Instituto de la Grasa**. Sevilla, Spain. [mensagem pessoal]

A amostra **V**, visualizada na Tabela 22, apesar de não apresentar valores tão discrepantes dos permitidos pela Legislação, mostra que os valores de ácido mirístico, margárico e araquídico estão acima do permitido. O valor de ácido esteárico também está muito próximo do limite máximo, mas não é possível afirmar se este azeite é realmente adulterado, nem tão pouco sugerir com que óleo é fraudado. Apenas pode-se suspeitar sua adulteração levando-se em consideração os resultados apresentados nos critérios de qualidade.

Peixoto e colaboradores (1998) analisaram 10 amostras de azeite de oliva comercializadas no Rio de Janeiro, sendo 5 delas de origem nacional (envasadas no Brasil) e 5 importadas (envasadas no país de origem). Através da análise de composição em ácidos graxos só foi possível detectar a adulteração de uma amostra, de origem nacional. Tratando-se de um azeite envasado no Brasil, a hipótese mais provável é que esta amostra tenha sido fraudada pela adição de óleo de soja, o que, posteriormente, foi confirmada pela análise de esteróis.

Aued-Pimentel e outros (2002) também realizaram a análise de composição em ácidos graxos em diversas amostras, a fim de detectar possíveis fraudes. Foram analisadas 236 amostras de azeite de oliva e foi constatado que 43 amostras, isto é, 18,2% apresentaram algum tipo de adulteração. Destas 39 estavam adulteradas com outros óleos vegetais de menor valor comercial. Em 31 amostras observou-se a presença de óleo de soja como adulterante, sendo que 29 eram amostras envasadas no Brasil. Em 5 amostras o provável adulterante era o óleo de girassol, sendo 2 amostras envasadas no Brasil e 2 na Argentina. Uma amostra foi encaminhada por um importador como azeite de oliva a granel, entretanto, constatou-se que se tratava de óleo de canola. Duas amostras, envasadas no Brasil, estavam adulteradas com gordura vegetal hidrogenada. Este tipo de adulteração é incomum e só pode ser confirmada através do perfil de ácidos graxos obtido em coluna cromatográfica de alta resolução, onde foram separados os isômeros *trans* dos ácidos graxos insaturados, presentes em gorduras hidrogenadas. Nestas amostras de azeite estes compostos estavam presentes em grande proporção, configurando a adulteração.

Casas *et al* (2003) estudaram diversos azeites, provenientes de azeitonas com grau de maturação diferente. Os resultados apresentaram uma nítida variabilidade dos diferentes ácidos graxos procedentes de azeitonas verdes, em relação às azeitonas maduras. Neste sentido, para as azeitonas verdes, observou-se um ligeiro aumento nos níveis de ácido oléico, esteárico e linoléico, assim como uma ligeira diminuição no teor de ácido palmítico.

Pode-se notar que a análise de composição em ácidos graxos é um parâmetro muito importante de avaliação, mas não pode confirmar a adulteração da maioria dos azeites, salvo se este for grosseiramente fraudado, como é o caso da amostra **E**. Segundo Peixoto, Santana e Abrantes (1998), relatam que 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 coluna capilar utilizada na análise de composição em ácidos graxos é também apropriada para separar e quantificar os isômeros *trans*. Assim, foi possível obter mais este dado experimental, que auxiliou na detecção de fraudes.

A presença de isômeros *trans* oléicos, linoléicos e linolênicos 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-RUÍZ, 2000).

A Resolução RDC nº 270 da ANVISA, de 22 de setembro de 2005, determina que os isômeros *trans* oléicos apresente, no máximo, 0,20% para azeite refinado e 0,40% para óleo de bagaço. Já para a soma dos isômeros *trans* linoléicos e *trans* linolênicos, o resultado não pode ultrapassar 0,30% para o azeite refinado e 0,35% para o óleo de bagaço. A Tabela 25 apresenta os valores de isômeros *trans* das amostras analisadas.

Tabela 25. Teor de isômeros *trans* dos Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem

<i>Amostra</i>	<i>Isôm. Trans (% m/m)</i>	
	(a)	(b)
A	0,01	0,09
B	0,05	<u>0,52</u>
C	0,01	0,03
D	0,00	0,09
E	0,04	<u>0,41</u>
F	0,02	0,05
G	<u>0,20</u>	<u>0,24</u>
H	0,03	0,05
I	0,02	0,06
J	0,02	0,09
K	0,01	0,13
L	0,02	0,09
M	0,02	0,05
N	0,02	0,08
O1	0,00	0,00
O2	0,05	0,07
P	0,02	0,09
Q	0,01	0,03
R	0,00	0,06
S	0,00	0,03
T	0,02	0,08
U	0,00	0,00
V	<u>0,27</u>	<u>0,28</u>
W	0,02	0,04
X	0,02	0,06
Y	0,02	0,03
Z	0,02	0,08
Aa	0,03	0,11
Bb	0,01	0,08
Cc	0,02	0,05

(a) Isômeros *trans* oléicos.

(b) Soma dos isômeros *trans* linoléicos e linolênicos.

Valores em negrito e sublinhado: acima do limite permitido por Legislação.

De acordo com a Tabela 25 deve-se notar que as amostras **G** e **V** apresentam altos teores de ácidos graxos *trans*. Através desses resultados, é possível sugerir, baseando-se na Legislação citada, que as amostras **G** e **V** podem ter sido adulteradas com azeite de oliva refinado ou até mesmo com óleo de bagaço. No entanto, tais suspeitas só podem ser confirmadas mediante a comparação com análises mais específicas.

Além das duas amostras já discutidas, somente as amostras **B** e **E** mostram valores significativamente altos para a soma dos isômeros *trans* linoléicos e *trans* linolênicos. Estes valores contribuem para sustentar as suspeitas de adulteração já propostas anteriormente.

Peixoto e colaboradores (1998) avaliaram 5 amostras nacionais (envasadas no Brasil) e 5 amostras importadas (envasadas no país de origem) de azeite de oliva comercializadas no Rio de Janeiro quanto ao teor de ácido eláidico (*trans* oléico). As amostras nacionais apresentaram valor muito acima do permitido por Legislação, variando entre de 6,6 a 15,5%, o que pode indicar a presença de óleos parcialmente hidrogenados, óleos reesterificados ou azeite de oliva refinado. Das amostras importadas, somente uma delas apresentou teor de 6,9% de ácido eláidico, ao contrário do declarado no rótulo.

Aued-Pimentel *et al* (1995), em trabalho para avaliar a qualidade e identidade de azeites de oliva comercializados no estado de São Paulo, também verificaram, em algumas amostras, a presença de isômeros *trans* através do perfil em ácidos graxos, mostrando, segundo os autores, um perfil com características de gordura vegetal hidrogenada.

4.2.2. Índice de Iodo e Saponificação Calculados

A Tabela 26 apresenta os teores de monoinsaturados, poliinsaturados e os índices de iodo e saponificação calculados.

Tabela 26. Teores de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e índices de iodo e de saponificação dos Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem

<i>Amostra</i>	<i>Monoinsaturados (%)</i>	<i>Poliinsaturados (%)</i>	<i>I. Iodo</i>	<i>I. Saponificação (¹)</i>
A	78,5	7,2	80	193
B	62,3	20,6	91	194
C	76,9	7,0	79	193
D	67,8	14,3	84	194
E	<u>35,2</u>	<u>52,0</u>	<u>121</u>	193
F	74,8	9,0	81	193
G	74,1	10,7	83	193
H	73,5	10,5	82	193
I	77,8	6,4	79	193
J	76,0	8,2	80	193
K	78,5	7,3	81	193
L	64,9	16,1	84	194
M	76,6	8,1	81	192
N	76,4	7,6	79	193
O1	77,6	5,8	77	194
O2	77,0	7,0	79	193
P	70,9	12,3	83	193
Q	77,8	6,5	79	192
R	78,3	6,4	79	193
S	79,6	5,1	78	192
T	65,0	15,3	83	194
U	78,4	6,8	80	193
V	69,7	12,0	81	194
W	77,8	6,9	80	192
X	76,3	8,1	80	193
Y	77,0	7,7	80	192
Z	75,1	8,8	80	193
Aa	77,5	7,6	80	192
Bb	63,2	16,9	85	194
Cc	79,2	5,7	79	192

(¹) Valores expressos em mg KOH/ g amostra.

Valores em negrito e sublinhado: acima do limite máximo permitido por Legislação.

De acordo com a antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, para azeites de oliva extra virgem e virgem, o índice de iodo deve estar entre 75 e 94, e o índice de saponificação entre 184 e 196.

Como pode ser observada na Tabela 26, a amostra **E** apresenta o índice de iodo e também os teores de mono e poliinsaturados totalmente fora do limite estabelecido por Legislação; isto indica, novamente, que este azeite é grosseiramente adulterado.

4.2.3. Determinação da Diferença do ECN 42 Experimental e Teórico

4.2.3.1. Estudos Preliminares

Antes do início das análises foi realizado um estudo que teve como principal objetivo a descoberta dos picos pertencentes ao grupo ECN42. Sabe-se que este grupo é composto por três triacilgliceróis predominantes (LLL, OLLn e PLLn), mas a coluna utilizada neste trabalho, apesar de fornecer uma eficiente separação dos compostos, não mostra claramente a separação por grupos de partição (ECN 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 e 54).

Por este motivo, foi necessário avaliar um óleo com alto teor dos ácidos graxos linoléico e linolênico para que o grupo com número de partição 42 se tornasse mais evidente, uma vez que isto não acontece com um azeite de oliva extra virgem. O óleo de soja foi a matéria-prima escolhida para a execução deste teste, pois possui alto teor do ácido graxo linoléico, ultrapassando 50% do total.

Em um primeiro momento, realizou-se a análise de composição triacilglicerólica teórica e por HPLC do óleo de soja. Analisando-se estes dados, foi possível separar os grupos por número de partição (38 a 54) e identificar os principais triacilgliceróis presentes em cada grupo. O cromatograma obtido por HPLC do óleo de soja pode ser visualizado na Figura 6.

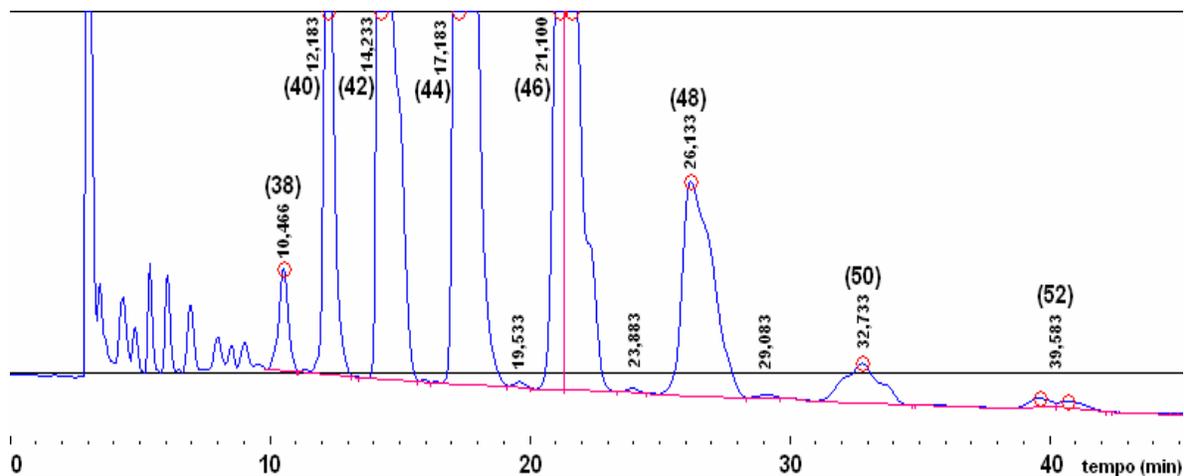


Figura 6. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC do óleo de soja.

O cromatograma da Figura 6, bem como os demais que aparecerão na seqüência, apresentam a mesma escala no eixo y. Apesar dos picos dos grupos 40 a 46 aparecer muito fora da escala para esta amostra, a mesma foi utilizada para que se pudesse observar a diferença entre os três gráficos com relação ao grupo ECN42, que é objeto de estudo neste trabalho.

Como já discutido anteriormente, o ácido graxo linoléico é predominante no óleo de soja e, por isso, o pico relacionado ao grupo com número de partição 42 é tão significativo. Os resultados da composição triacilglicerólica deste óleo encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27. Composição triacilglicerólica do óleo de soja.

<i>Triacilglicerídeos</i>	<i>Grupo ECN</i>	<i>Composição Teórica</i>	<i>Composição HPLC</i>
LLnLn	38	0,72	1,34
LLLn + PLnLn	40	6,41	7,71
LLL + PLLn	42	24,11	25,11
PLL + OLL	44	33,86	31,54
POL + OOL	46	22,92	21,93
POO + SOL	48	8,51	9,44
PSO + SOO	50	2,41	2,05
PLBe + OLBe	52	0,84	0,88
POBe + OOB	54	0,22	—

Observando-se a Tabela 27, é possível notar que os valores de composição triacilglicerólica teórica e por HPLC são bastante parecidos, o que nos permite afirmar, com segurança, que os grupos de triacilgliceróis foram devidamente identificados.

Obtida esta informação inicial, realizaram-se dois novos testes: identificação dos grupos de triacilgliceróis em um azeite de oliva extra virgem e, o outro, um azeite de oliva extra virgem com adição intencional de óleo de soja. Este procedimento foi fundamental para que se visualizasse, com precisão, a localização do grupo ECN42 e, principalmente, de seus três principais triacilgliceróis. Os cromatogramas obtidos dos azeites de oliva extra virgem e do adicionado de óleo de soja encontram-se nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

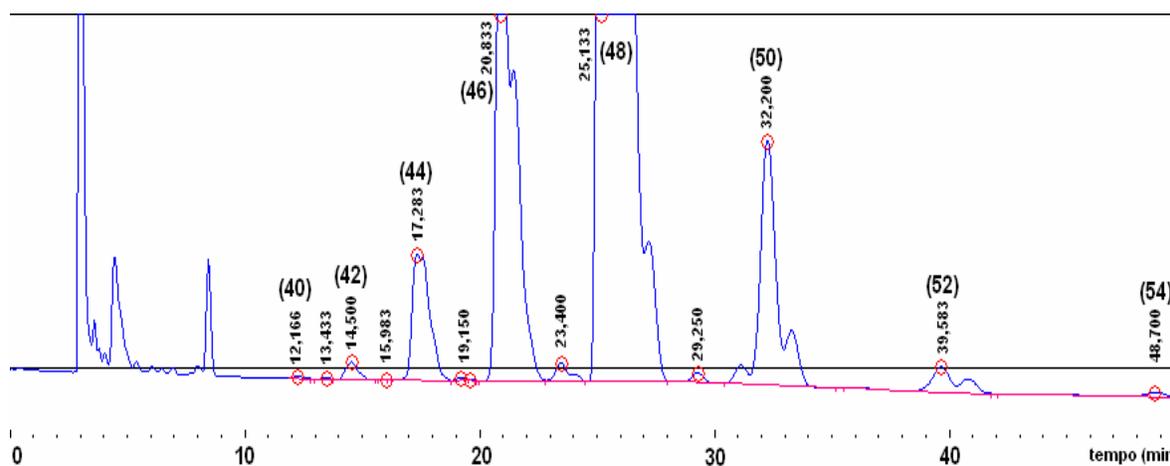


Figura 7. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC de uma amostra de azeite de oliva extra virgem.

Deve-se observar, na Figura 7, que o grupo ECN42 é muito pequeno, não atingindo nem 0,5% do total de triacilgliceróis presentes no azeite de oliva. Este resultado é totalmente esperado, pois se trata de um azeite de oliva extra virgem.

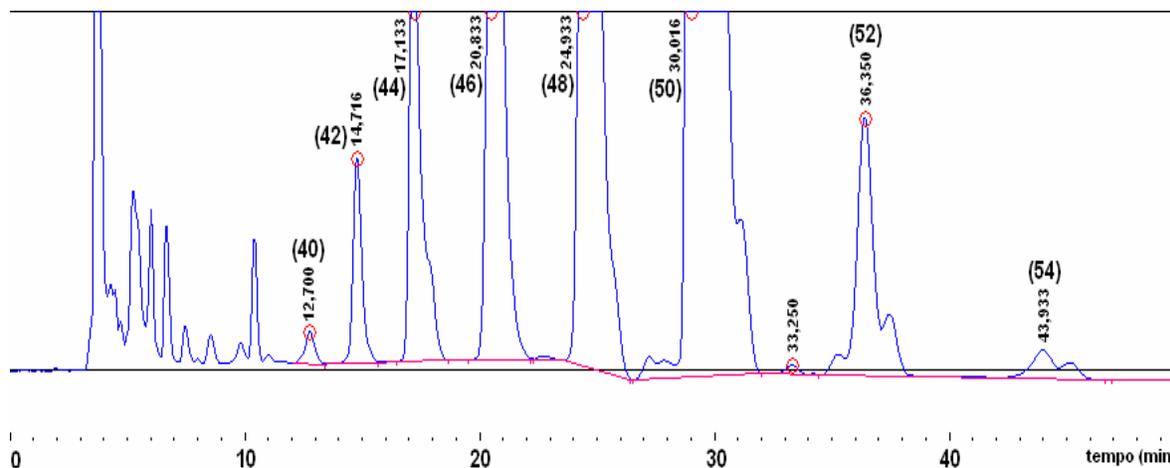


Figura 8. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC de uma amostra de azeite de oliva extra virgem com adição de óleo de soja.

A Figura 8, por sua vez, apresenta um pico para o grupo ECN42 relativamente maior que o anterior, representando cerca de 2% dos triacilgliceróis totais. Os resultados obtidos para as três amostras testadas podem ser conferidos na Tabela 28.

Tabela 28. Composição triacilglicerólica por HPLC das três amostras analisadas.

<i>Triacilglicerídeos</i>	<i>Grupo ECN</i>	<i>Óleo de Soja</i>	<i>Oliva + Soja</i>	<i>Oliva Extra</i>
LLnLn	38	1,34	—	—
LLLn + PLnLn	40	7,71	0,36	0,04
LLL + PLLn	42	25,11	2,09	0,41
PLL + OLL	44	31,54	17,90	3,86
POL + OOL	46	21,93	19,10	17,61
POO + SOL	48	9,44	53,22	69,11
PSO + SOO	50	2,05	6,22	7,65
PLBe + OLBe	52	0,88	1,04	1,16
POBe + OOB	54	—	0,07	0,16

Analisando-se a Tabela 28, pode-se perceber valores totalmente coerentes. O grupo ECN 42, por exemplo, presente em baixa quantidade no azeite de oliva extra virgem, apresentou um crescimento significativo em decorrência da

adição do óleo de soja. Paralelamente, o grupo 44 também teve um crescimento, mas desta vez o aumento foi muito grande. Este comportamento é completamente explicado, uma vez que este grupo é o de maior predominância no óleo de soja, utilizado na contaminação do azeite de oliva extra virgem. Tratando-se ainda de aumento de porcentagem, os grupos 40 e 46 também apresentaram o mesmo perfil, mas, desta vez, a mudança foi pouco significativa.

Por outro lado, inversamente ao que foi discutido até o momento, os grupos 48, 50, 52 e 54 apresentaram uma diminuição da porcentagem total dos triacilgliceróis correspondentes. Assim, pode-se notar que o azeite de oliva extra virgem, que possui o grupo 48 como predominante, sofreu uma considerável diminuição quando adicionado de óleo de soja, comportamento este totalmente justificável pela presença inferior a 10% deste grupo no óleo de soja. Os demais grupos citados também sofreram modificações; no entanto, as variações foram muito mais sutis.

4.2.3.2. Procedimento Experimental

A análise de ECN42, definida como a determinação da diferença entre a quantidade real e a teórica de triacilgliceróis com número de partição 42, foi realizada em três fases distintas: determinação da composição em ácidos graxos (já discutida anteriormente), cálculo teórico da composição de triacilgliceróis com ECN42, através do programa computacional desenvolvido por Cortesi, Rovellini e Fedeli (1990) e, por último, a determinação por HPLC do triacilglicerol ECN42, como apresentado no item 4.2.3.1.

A Figura 9 apresenta um exemplo de azeite de oliva extra virgem. Como pode ser visto, inseriu-se nesta planilha os valores obtidos na composição em ácidos graxos na linha denominada input FA – composition e, através de fórmulas matemáticas pré-estabelecidas foram calculados, automaticamente, os valores teóricos do grupo de triacilgliceróis equivalente ao peso molecular 42 (ECN42).

Calculation of theoretical triglyceride composition (1,3-R-2-R) V3							
Fill in the yellow fields!							
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4	MW
Area % (GLC)	P	S	Po	O	L	Ln	Sum
Input FA-Composition	11,4	3,7	1,0	76,4	5,8	0,7	99,0
Corr. FA-Composition	12,6	3,6	1,1	76,2	5,8	0,7	100,0
Theoretical Composisiton of Triglycerides with ECN42:						LLL	0,01922
						PoLL	0,01119
						PoPoL	0,00217
						PoPoPo	0,00014
						OLnL	0,18121
						PoOLn	0,03519
						PLnL	0,03274
						PPoLn	0,00636
						SLnLn	0,00057
						Theoretical value ECN42:	0,2888
						HPLC value ECN42:	0,3507
						Difference ECN42:	0,0619

Figura 9. Programa computacional baseado em Cortesi *et al.* (1990).

Posteriormente, realizou-se a análise de triacilgliceróis por HPLC e inseriu-se este valor na célula correspondente. Por fim, a planilha calculou a diferença entre os valores teórico e prático dos triacilgliceróis com ECN 42.

A Resolução da União Europeia (2003), o Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), e a antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, de 23 de setembro de 1999, prevêem um valor máximo na diferença ECN42 de 0,20 para azeites de oliva extra virgem e virgem. Portanto, o azeite apresentado na Figura 9, pela análise de ECN42, não é adulterado; todavia, uma fraude somente poderá ser confirmada após a realização de um conjunto de análises que irão prever a qualidade e a pureza da amostra em questão.

Desta maneira, pode-se observar que a Tabela 29 mostra apenas os valores da diferença de ECN42, uma vez que este é o resultado final da análise e é a partir dele que é possível detectar se alguns azeites são adulterados ou não.

Tabela 29. Valores de diferença de ECN42 para Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem.

<i>Amostra</i>	<i>Diferença ECN 42</i>
A	0,0685
B	<u>3,3712</u>
C	0,0303
D	0,1284
E	<u>6,4346</u>
F	0,1364
G	<u>0,9052</u>
H	0,0883
I	0,0340
J	0,0572
K	0,0685
L	<u>0,7823</u>
M	0,0740
N	0,0505
O1	0,0840
O2	0,0305
P	<u>0,2844</u>
Q	0,0631
R	0,0469
S	0,0241
T	0,1017
U	0,0852
V	0,1419
W	0,1161
X	0,1022
Y	0,0706
Z	0,0783
Aa	0,0776
Bb	<u>0,1979</u>
Cc	0,0458

Valores em negrito e sublinhado: acima do limite máximo permitido por Legislação.

Através da análise de ECN42 apenas 6 azeites apresentaram resultados acima do limite permitido por Legislação. Na Tabela 29, visualizada anteriormente, pode-se perceber que a amostra **E**, que já apresentou adulteração grosseira através da composição em ácidos graxos, também apresenta na análise de ECN42 um valor muito alto. Isto indica que este azeite foi fraudado com um óleo vegetal de composição totalmente diferente do azeite de oliva. A Figura 10, a seguir, apresenta o cromatograma obtido pela amostra **E** na análise por HPLC.

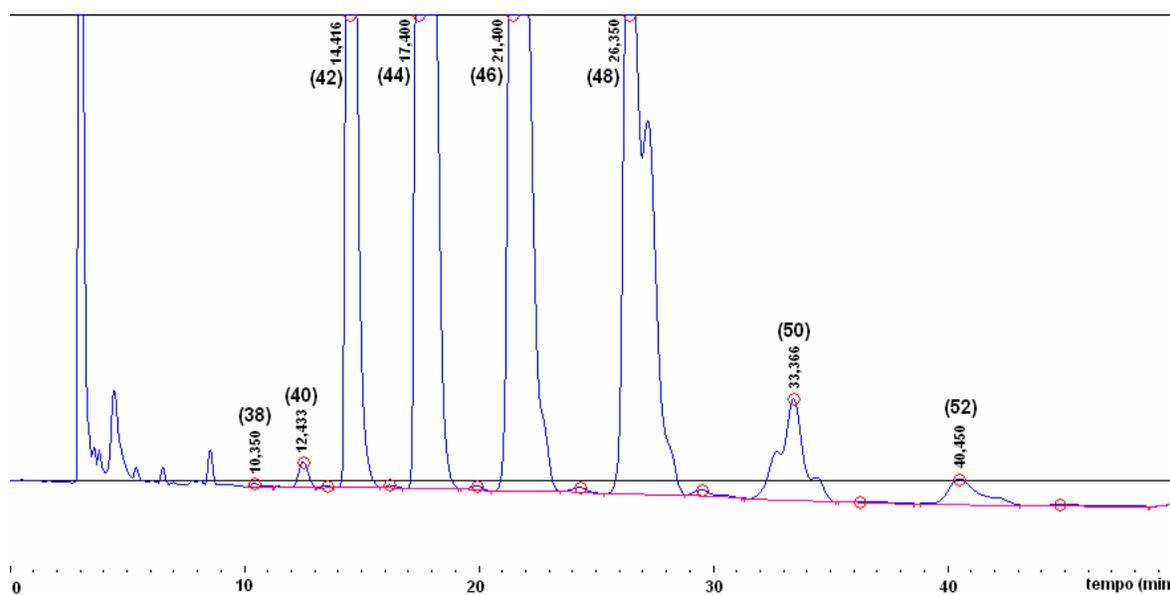


Figura 10. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **E**.

Como pode ser visto na Figura 10, os grupos por número de partição predominantes na amostra **E** são: 42, 44, 46 e 48, perfil muito diferente pelo apresentado na análise de um azeite de oliva extra virgem (Figura 7), que mostrou a predominância dos grupos 46, 48 e 50. Novamente é possível perceber que esta amostra tem uma composição totalmente diferente de um azeite de oliva extra virgem, como as análises anteriores já têm mostrado.

A composição triacilglicerólica por HPLC do óleo de girassol, do azeite de oliva extra virgem e da amostra **E**, com suas respectivas porcentagens de cada grupo ECN (38 a 54), estão apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30. Composição triacilglicerólica por HPLC do óleo de girassol, do azeite de oliva extra virgem e da amostra **E**.

<i>Grupo ECN</i>	<i>Óleo de Girassol</i>	<i>Oliva Extra</i>	<i>Amostra E</i>
38	0,34	—	0,03
40	0,45	0,04	0,31
42	27,03	0,41	21,33
44	36,92	3,86	31,68
46	22,48	17,61	22,56
48	9,28	69,11	19,62
50	2,25	7,65	3,21
52	1,12	1,16	1,11
54	0,13	0,16	0,15

Analisando-se a Tabela 30, pode-se perceber que a amostra **E** apresenta claras evidências de adulteração com óleo de girassol. Isto porque ocorreu um aumento bastante significativo para os grupos ECN 42 e 44 e uma diminuição também muito significativa para os grupos 48 e 50. Estes resultados, somados aos apresentados anteriormente, somam provas de um azeite grosseiramente adulterado.

Os azeites **B**, **G** e **L** também apresentam valor muito fora do limite permitido por Legislação, indicando adulteração destes azeites. As Figuras 11, 12 e 13, apresentam os cromatogramas obtidos pelas amostras citadas na análise de ECN42 por HPLC.

Anteriormente, na análise de composição em ácidos graxos, foi relatado que, no caso do azeite **B** ser adulterado com óleo de soja, o resultado seria supostamente confirmado com a análise de ECN42. Neste caso, como o valor apresentado para esta análise é considerado muito alto, o forte indício de adulteração com óleo de soja permanece e, desta vez, mais consolidado. A seguir, na Figura 11, pode-se visualizar o cromatograma da amostra **B**, obtido por HPLC.

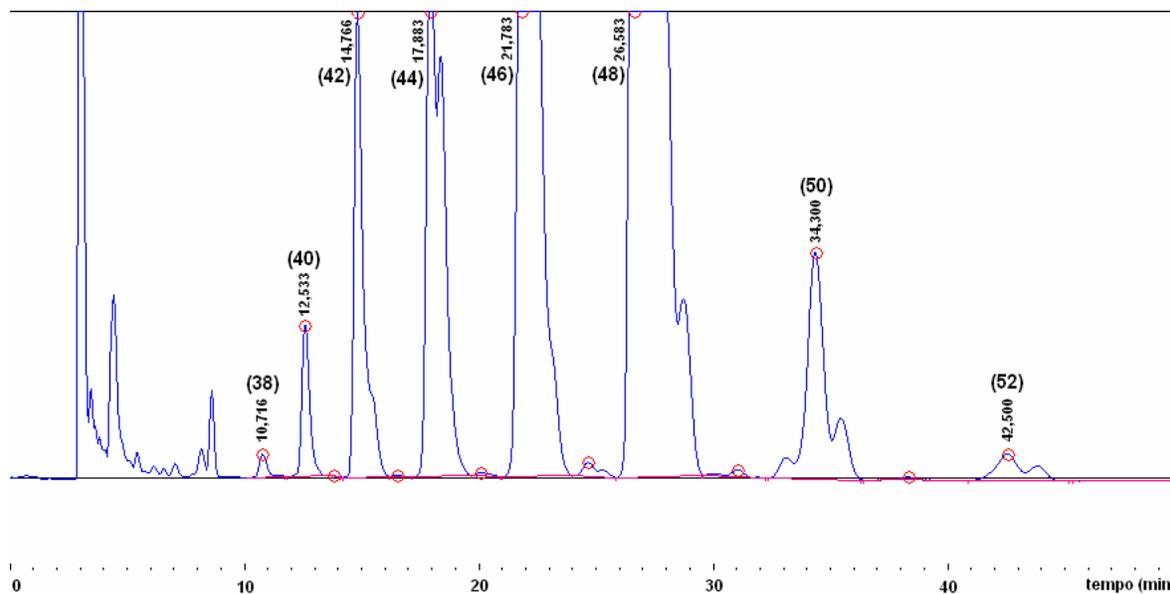


Figura 11. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **B**.

De acordo com a Figura 11, a amostra **B** apresenta um brusco aumento dos grupos 42 e 46 e uma diminuição muito significativa no grupo 48. A Tabela 31, a seguir, mostra o resultado das porcentagens dos grupos ECN em comparação ao óleo de soja, que provavelmente é o óleo adulterante desta amostra.

Tabela 31. Composição triacilglicerólica por HPLC do óleo de soja, do azeite de oliva extra virgem e da amostra **B**.

<i>Grupo ECN</i>	<i>Óleo de Soja</i>	<i>Oliva Extra</i>	<i>Amostra B</i>
38	1,34	—	0,24
40	7,71	0,04	1,47
42	25,11	0,41	5,57
44	31,54	3,86	11,20
46	21,93	17,61	21,77
48	9,44	69,11	51,92
50	2,05	7,65	6,07
52	0,88	1,16	1,08
54	—	0,16	—

Para as amostras **G** e **L**, apesar de resultarem em altos valores na análise de ECN42, não é possível afirmar com certeza qual é o óleo adulterante, apenas pode-se dizer, com certeza, que as amostras foram fraudadas com algum tipo de óleo vegetal refinado. Os cromatogramas das amostras **G** e **L** podem ser visualizados nas Figuras 12 e 13.

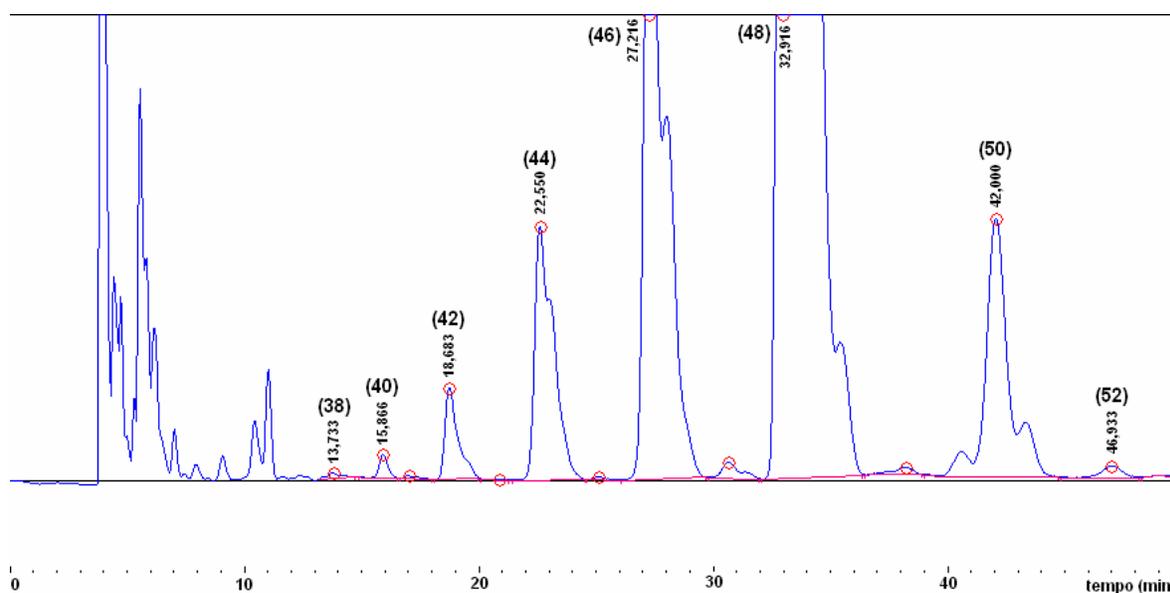


Figura 12. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **G**.

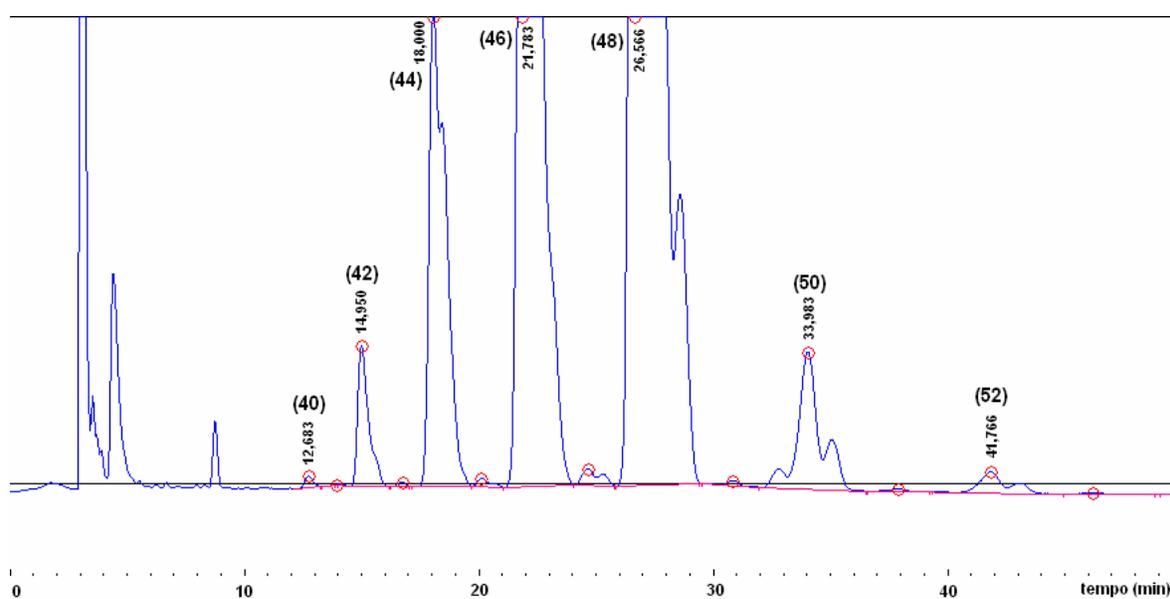


Figura 13. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **L**.

A seguir, a Tabela 32 apresenta os resultados das porcentagens dos grupos ECN das amostras **G** e **L** em comparação ao azeite de oliva extra virgem.

Tabela 32. Composição triacilglicerólica por HPLC do azeite de oliva extra virgem e das amostras **G** e **L**.

<i>Grupo ECN</i>	<i>Oliva Extra</i>	<i>Amostra G</i>	<i>Amostra L</i>
38	—	0,11	—
40	0,04	0,26	0,11
42	0,41	1,55	1,96
44	3,86	5,94	9,95
46	17,61	19,44	29,63
48	69,11	64,95	53,67
50	7,65	7,43	3,91
52	1,16	0,32	0,77
54	0,16	—	—

De acordo com a Tabela 32, no caso da amostra **G**, os grupos 42, 44 e 46 sofreram um ligeiro aumento e os grupos 48 e 50, uma ligeira diminuição. Já para a amostra **L**, houve um aumento muito mais significativo dos grupos 44 e 46 em relação à anterior, e uma diminuição mais intensa nos grupos 48 e 50. Os grupos 42 e 52, por sua vez, tiveram um importante aumento e uma pequena diminuição, respectivamente. Apesar desta Tabela apresentar dados importantes, não é possível predizer qual é o óleo adulterante destas amostras.

Por fim, as amostras **P** e **Bb** também apresentaram valores acima do permitido. De acordo com as três legislações citadas anteriormente, o valor máximo permitido de diferença ECN42 é de 0,30 para azeite de oliva refinado.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 29, pode-se sugerir a fraude da amostra **P** com azeite de oliva refinado. No entanto, há dúvidas quanto ao real adulterante da amostra **Bb**, mas também é possível que seja o

próprio azeite de oliva refinado. Desta maneira, tais suposições só poderão ser confirmadas em conjunto com outras análises.

As Figuras 14 e 15, a seguir, mostram os cromatogramas obtidos por HPLC para as amostras **P** e **Bb**.

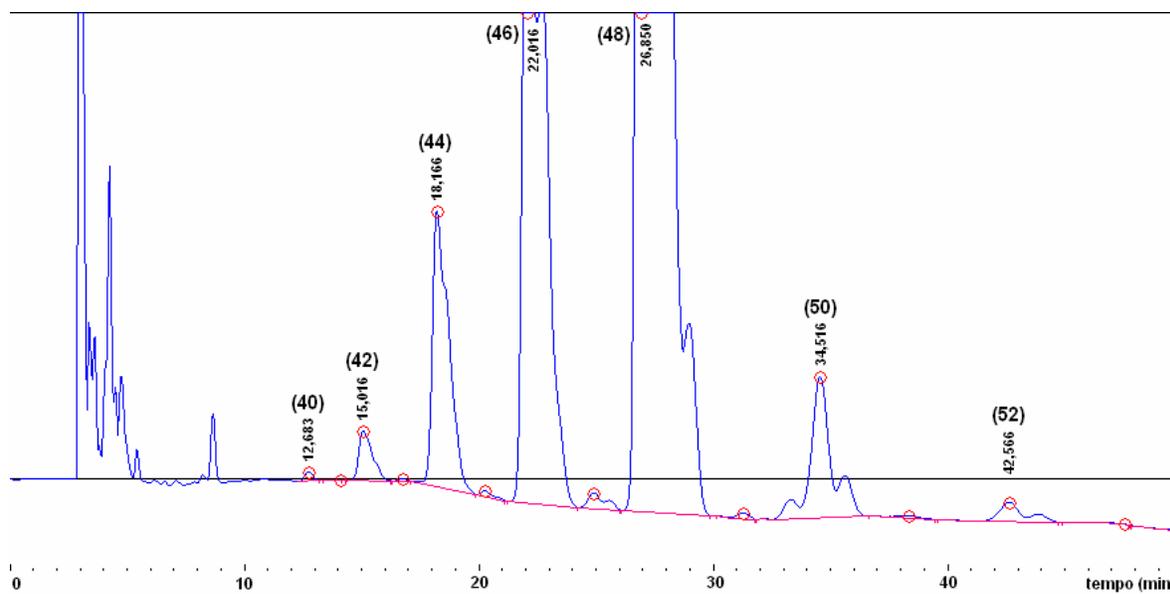


Figura 14. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **P**.

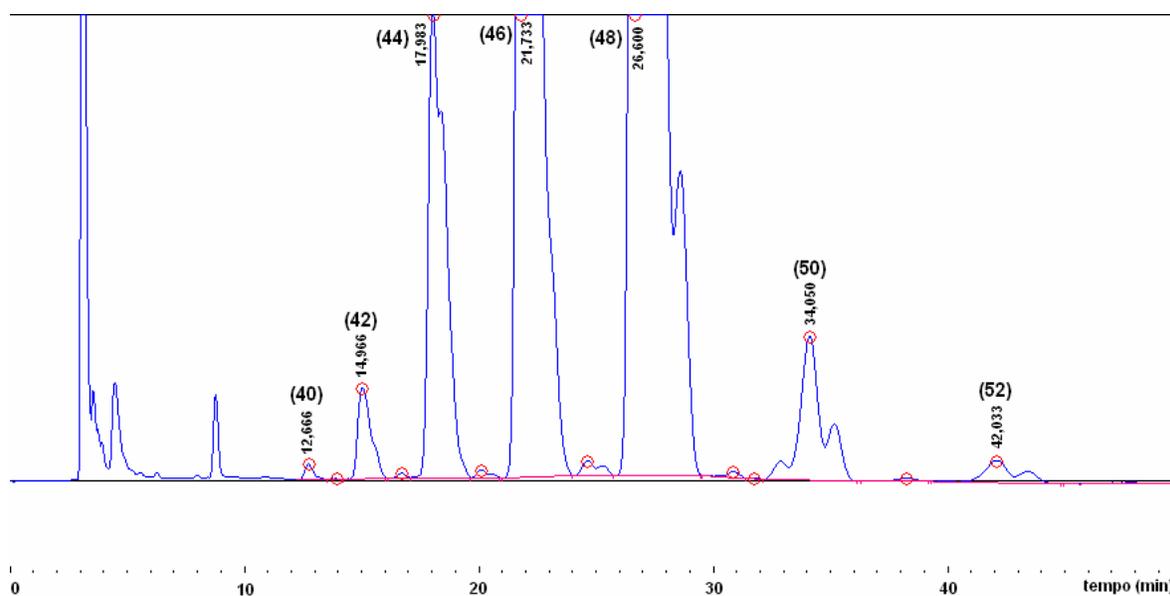


Figura 15. Cromatograma da análise de ECN42 por HPLC da amostra **Bb**.

De acordo com as figuras anteriores e a Tabela 33, pode-se perceber que as amostras **P** e **Bb** apresentam características distintas e, além disso, não parecem ser adulteradas com óleo de soja.

Tabela 33. Composição triacilglicerólica por HPLC do azeite de oliva extra virgem e das amostras **P** e **Bb**

<i>Grupo ECN</i>	<i>Óleo de Soja</i>	<i>Oliva Extra</i>	<i>Amostra P</i>	<i>Amostra Bb</i>
38	1,34	—	—	—
40	7,71	0,04	0,11	0,15
42	25,11	0,41	1,00	1,53
44	31,54	3,86	6,62	9,71
46	21,93	17,61	25,76	31,42
48	9,44	69,11	61,13	52,05
50	2,05	7,65	4,62	4,15
52	0,88	1,16	0,76	0,99
54	—	0,16	—	—

A amostra **Bb**, diferentemente da amostra **B**, não mostra evidências de fraude com óleo de soja; isto porque os grupos 40 e 42 apresentam valores muito baixos em relação ao óleo de soja que, caso fosse o óleo adulterante, seria responsável pela mudança do perfil de triacilgliceróis destes grupos. Além disso, o grupo 46 da amostra **Bb** jamais poderia apresentar porcentagem superior ao óleo de soja.

A amostra **P**, por sua vez, apresenta resultados semelhantes à amostra **Bb** e, mantendo-se a mesma linha de raciocínio, é possível afirmar que esta amostra não é fraudada com óleo de soja.

Analisando-se as 6 amostras citadas, pode-se perceber que a análise de ECN42 é um importante parâmetro para se confirmar determinada suspeita, mas se faz necessário a realização de outras análises complementares, uma vez

que nem todas as fraudes podem ser detectadas através da composição triacilglicerólica por HPLC.

Andrikopoulos e colaboradores (2001) estudaram a determinação a composição triacilglicerólica por ECN42 usando o HPLC, em comparação à composição triacilglicerólica por cromatografia gasosa (GC), e detectaram que aquela realizada por HPLC foi muito melhor, permitindo uma estimativa mais positiva em relação ao estudo pelo método utilizando GC.

Concluíram, ainda, que a metodologia de composição triacilglicerólica é eficaz na detecção de fraudes de azeites de oliva pela adição de outros óleos de sementes oleaginosas, mas nem sempre é capaz de prever se um azeite de oliva extra virgem (ou virgem) é adulterado com azeite de oliva refinado ou resíduo do mesmo. Além disso, a adulteração do azeite de oliva com outros óleos vegetais pode ser detectado a uma concentração de 5% ou superior e, em alguns casos particulares, 2% ou superior, com base na porcentagem quantitativa da trilinoleína (LLL), que estão quase ausentes em azeites de oliva, mas presentes em níveis relativamente altos em óleos adulterantes (ANDRIKOPOULOS; GIANNAKIS; TZAMTZIS, 2001).

4.2.4. Quantificação de Estigmastadienos

4.2.4.1. Estudos Preliminares

No início da execução da determinação de estigmastadieno, foram realizados vários testes preliminares que tiveram como objetivo o domínio da metodologia, mas visaram, principalmente, a adequação de alguns fatores para a melhor execução desta análise. Em um primeiro momento, foram testadas algumas marcas de hexano PA. Após o fracionamento destes hexanos através da coluna de sílica gel, constatou-se que o resultado após a injeção no cromatógrafo

gasoso não foi satisfatório. Isto porque o hexano PA já mostrava nos cromatogramas muitos picos indesejáveis e que, conseqüentemente, atrapalhariam nas análises dos resultados do estigmastadieno nas amostras de azeite propriamente ditas.

A próxima tentativa foi destilar o hexano PA, com o intuito de purificar o solvente. Testou-se a destilação com extrator soxhlet, removendo-se a cabeça e a cauda e recolhendo-se, então, a fração intermediária. Após este procedimento, injetaram-se as frações do hexano PA destilado. Os resultados foram ligeiramente melhores que os testes anteriores, mas concluiu-se que este processo seria economicamente inviável, e que pouco alterariam os resultados finais nos cromatogramas. Com base nesses testes, decidiu-se então utilizar o hexano grau HPLC, marca Dinâmica. Vale ressaltar ainda que todas as amostras de azeite foram analisadas com o solvente de um mesmo lote.

Segundo a Resolução da União Europeia (2003), não há no mercado nenhum padrão disponível para a confirmação da presença de estigmastadieno. De acordo com tal Legislação, para se obter uma referência dos estigmastadienos, deve-se utilizar na análise qualquer óleo vegetal refinado, mas em menor quantidade (1 a 2g de óleo) pois estão presentes em abundância. Após a injeção em cromatógrafo gasoso, os estigmastadienos dão lugar a um pico importante e de fácil identificação.

Como recomendado, realizou-se a extração da matéria insaponificável de um óleo vegetal refinado com hexano, e o óleo utilizado foi o de soja. A matéria insaponificável foi então fracionada através da coluna de sílica gel e os resultados analisados por cromatografia em fase gasosa (GC). Estudos anteriores indicaram a necessidade de se descartar a primeira fração do eluído, contendo 20 mL e de se recolher a segunda fração, contendo 60 mL, que posteriormente seria evaporada e

injetada no cromatógrafo gasoso. Utilizou-se, como padrão interno, o colest-3,5-dieno, 99% de pureza, marca Sigma, na concentração de 20 mg/ kg.

O uso de solução de padrão interno desde o início do preparo da matéria insaponificável constitui-se em uma medida que garante a correção das perdas decorrentes das várias etapas da metodologia (BECKER, 2004). Além disso, a solução de colestadieno também possibilita a quantificação do estigmastadieno. Lognay e outros (1992) relatam que o padrão interno deve ser utilizado antes da etapa de saponificação do óleo, a uma concentração apropriada, de modo que a altura do seu pico seja proporcional ou semelhante à do composto a ser determinado.

Analisando-se os resultados obtidos com o fracionamento da soja, percebeu-se uma certa dificuldade em identificar o estigmastadieno. Por isso, o mesmo procedimento foi repetido utilizando-se, neste momento, um azeite de oliva refinado. Após os novos testes, detectou-se com facilidade o pico do estigmastadieno.

Durante a fase inicial de testes, foram testadas duas colunas capilares. A primeira coluna utilizada foi a LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano), com dimensões 30 m, Ø int. 0,25 mm, 0,3 µm filme. Fluxo coluna - 54,5mL/ min; Temperatura do detector: 320°C; injetor: 300°C; forno: 225°C/ 10 min., 3°C/ min – 20 min., 285°C/ 20 min. ; Gás de arraste - He; Volume de injeção 1µL, split – 1:15.

Os cromatogramas do padrão interno (colest-3,5-dieno) e da amostra de azeite refinado, injetados na coluna LM-5, podem ser visualizados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

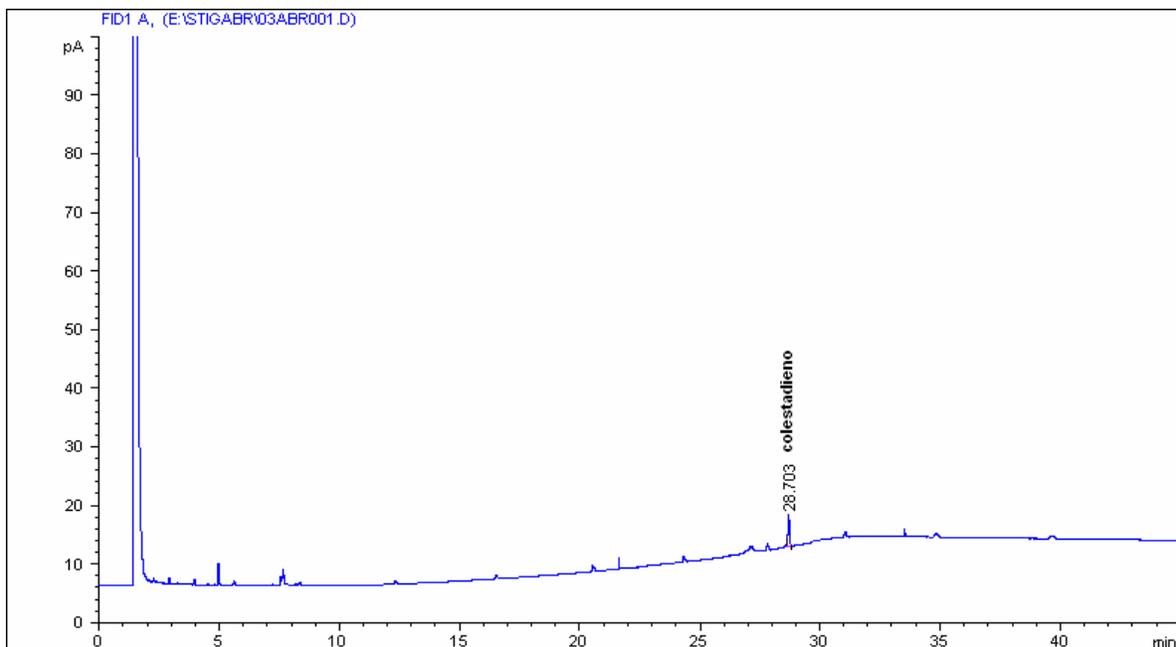


Figura 16. Cromatograma do padrão interno colest-3,5-dieno injetado na coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano).

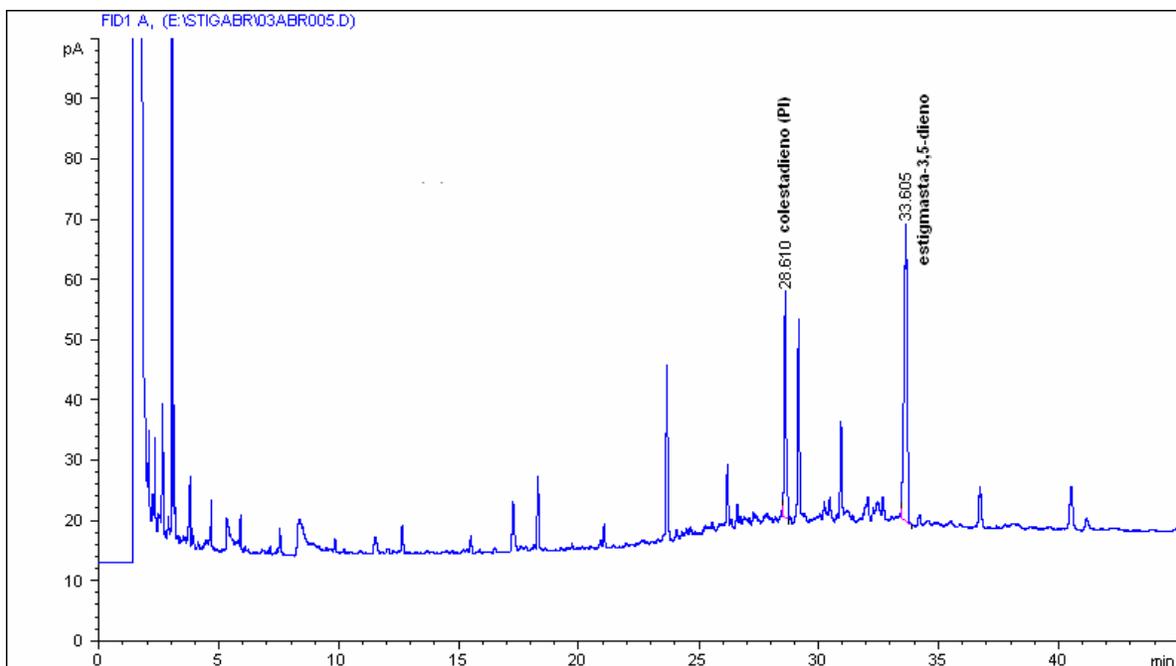


Figura 17. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite refinado injetado na coluna LM-5 (5% fenil 95% metil polisiloxano).

Analisando-se o cromatograma apresentado na Figura 17, é possível notar o padrão interno (colesta-3,5-dieno) no tempo de 28,610 min. e o estigmastadieno no tempo de retenção de 33,605 minutos. Para a coluna LM-5, o tempo de retenção relativo é de 1,17. Nestas condições de análise, a coluna LM-5 apresentou um ótimo resultado, totalmente satisfatório com relação ao que se espera de um cromatograma para a análise de estigmastadieno.

Paralelamente, testou-se uma segunda coluna, denominada HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano), com dimensões 60 m, Ø int. 0,25 mm, 0,25 µm filme. Fluxo coluna - 1,0 mL/ min; Velocidade linear de 24 cm/ seg; Temperatura do detector: 320°C; injetor: 320°C; forno: 235°C/ 6 min., 2°C/ min – 25 min., 285°C/ 14 min. ; Gás de arraste - He; Volume de injeção 1µL, split – 1:15.

Os cromatogramas do padrão interno (colesta-3,5-dieno) e da amostra de azeite refinado, injetada na coluna HP-5, estão apresentados a seguir, nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

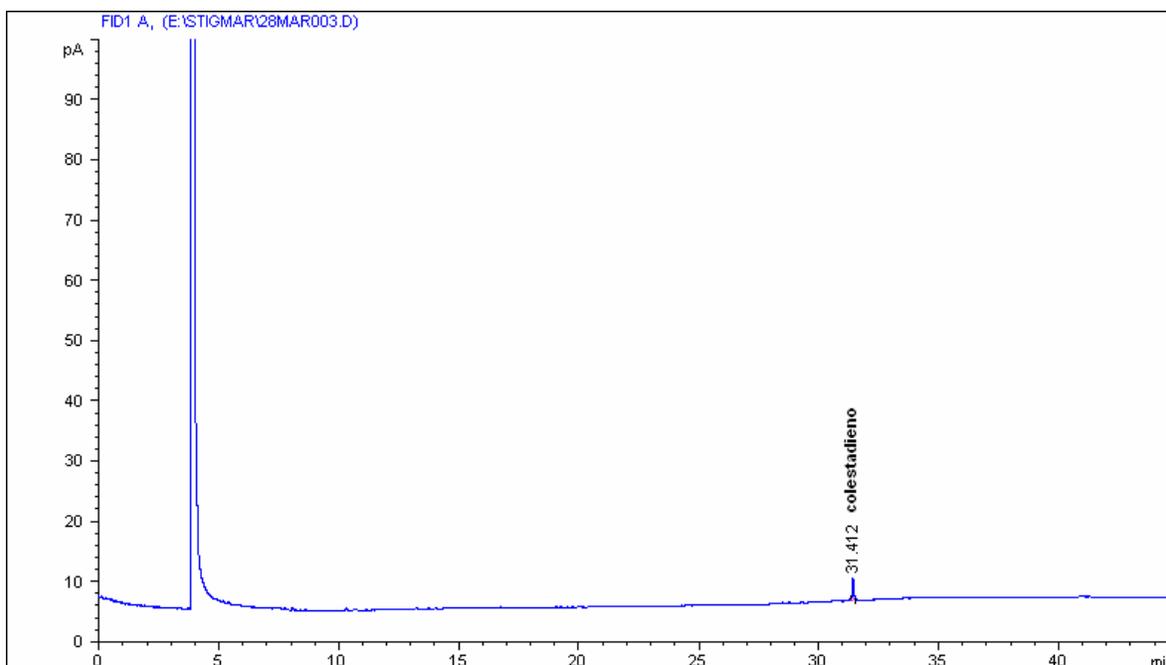


Figura 18. Cromatograma do padrão interno colesta-3,5-dieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

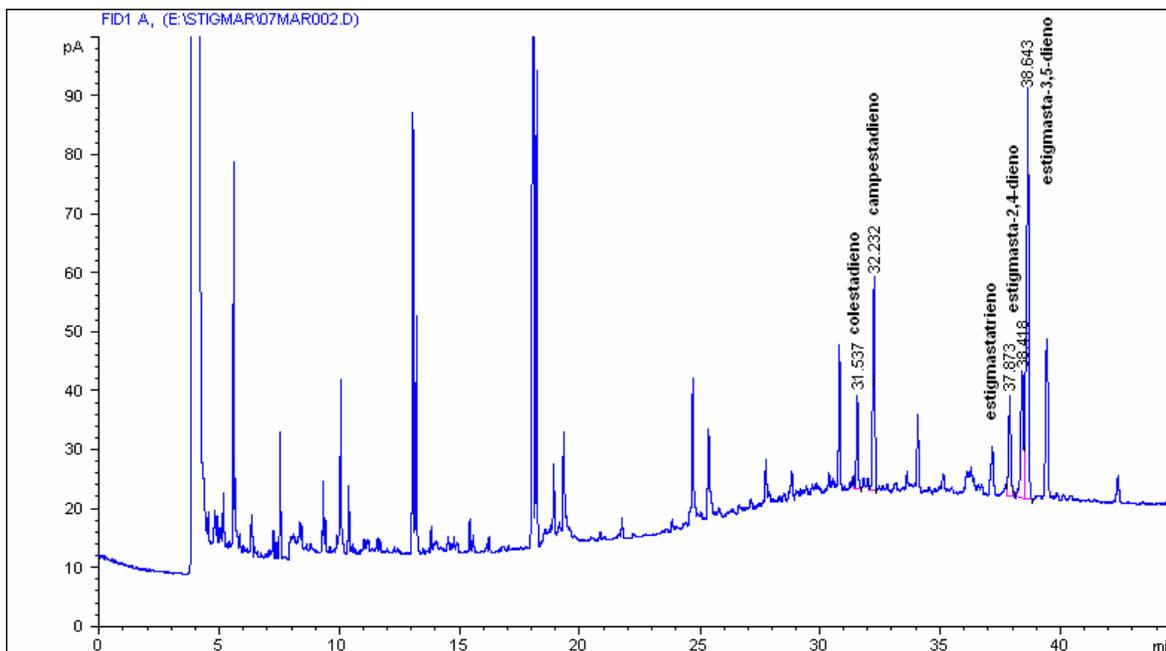


Figura 19. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite refinado injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

No cromatograma apresentado pela Figura 19 é possível visualizar uma importante observação feita por Arturo Cert *. Segundo o autor, na segunda fração de um azeite de oliva refinado deve aparecer claramente o colestadieno (padrão interno), o campestadieno, o estigmastatrieno e o estigmastadieno, em ordem crescente de tempo de retenção.

Segundo Trujillo-Quijano & Costa (1995), o estigmasta-3,5-dieno, o estigmastatrieno, o campestadieno e o campestatrieno são os principais produtos de degradação dos esteróis, formados a partir do β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e brassicasterol, respectivamente. Assim, a Figura 19 mostra o colestadieno (padrão interno) no tempo de retenção de 31,537 minutos, o campestadieno no tempo de 32,232 minutos, o estigmastatrieno com 37,873 minutos, e o estigmastadieno aparece na forma de seus dois isômeros, o estigmasta-2,4-dieno no tempo 38,418 minutos e o estigmasta-3,5-dieno com 38,643 minutos.

* CERT, Arturo. **Instituto de la Grasa**. Sevilla, Spain. [mensagem pessoal]

O tempo de retenção relativo para o padrão interno e o estigmastadieno nesta coluna é de 1,22 minutos. Da mesma forma que a coluna anterior, a coluna HP-5 apresentou excelentes resultados, igualmente satisfatórios para a análise de estigmastadieno.

No entanto, analisando-se separadamente o desempenho das duas colunas testadas, deve-se observar que a segunda coluna é mais sensível, sendo capaz de detectar o estigma-3,5-dieno e seu isômero. Por este motivo, escolheu-se para a análise de estigmastadieno, a coluna HP-5.

Após a realização dos testes nas duas colunas, e a conseqüente escolha da coluna HP-5 para a execução deste trabalho, mais um teste foi realizado com o intuito de se assegurar a identificação do estigmastadieno no tempo de retenção apresentado.

Desta maneira, realizou-se a análise de estigmastadieno com uma amostra de azeite de oliva refinado, um padrão IUPAC (Internacional Union Of Pure & Applied Chemistry) contendo 25,4 mg/kg de estigmastadieno, disponível no Laboratório de Óleos e Gorduras. Esta amostra estava armazenada em congelador a - 10°C há 10 anos. Apesar do longo período de estocagem, estudos comprovaram que o estigmastadieno é um composto quimicamente estável e que não sofre modificações ao longo do tempo.

Cert e colaboradores (1994) analisaram duas amostras de azeite de oliva virgem, estocadas há 8 e 9 anos. Ambas apresentaram altos valores de acidez e extinção específica, mas o estigmastadieno não foi encontrado. Estes resultados mostram que este composto não foi produzido durante o longo tempo de estocagem, sendo que o armazenamento causou apenas a oxidação e a hidrólise dos lipídeos. Bonvehí e outros (2001) também relatam que os produtos de desidratação de esteróis não são formados durante a estocagem.

A Figura 20, a seguir, apresenta o cromatograma resultante da análise do azeite de oliva refinado padrão IUPAC.

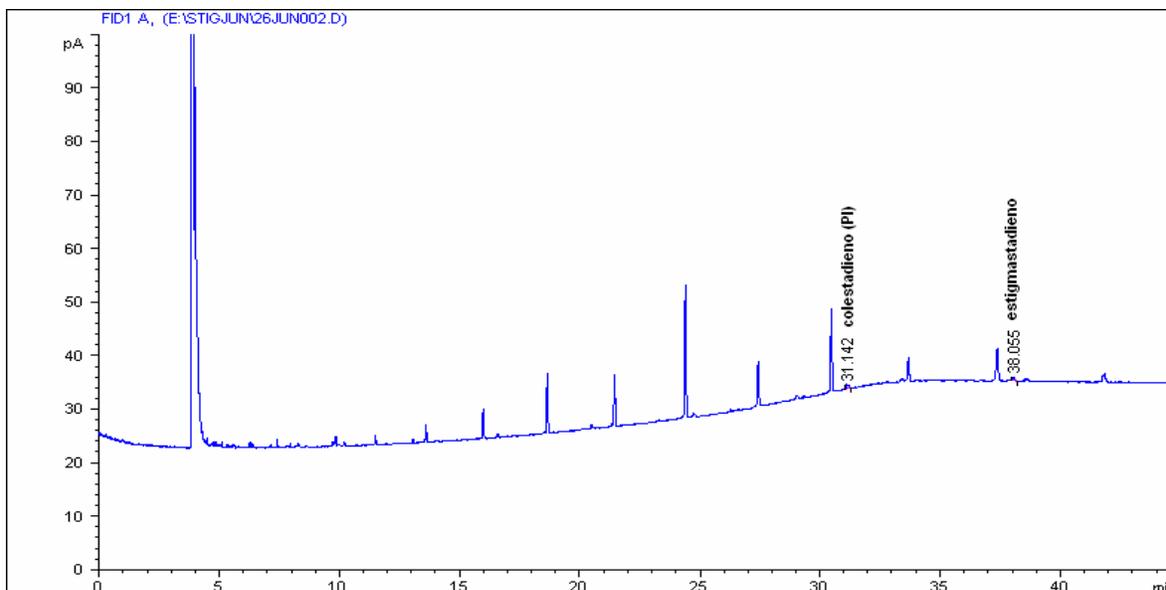


Figura 20. Cromatograma da análise de estigmastadieno de um azeite padrão IUPAC contendo 25,4 mg/kg de estigmastadieno, injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

Como pode ser visualizado na Figura 20, o padrão interno (colestadieno) aparece no tempo de retenção de 31,142 minutos e o estigmastadieno no tempo de 36,055 minutos.

O Quadro 4, por sua vez, mostra os resultados da análise de estigmastadieno após a integração dos picos cromatográficos obtidos por cromatografia em fase gasosa. A auto integração foi realizada através do software Agilent ChemStation Plus, versão A.08xx, utilizado em conjunto com o cromatógrafo marca CGC Agilent 6850 Series GC System com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

Quadro 4. Resultados obtidos da análise de estigmastadieno com o azeite de oliva refinado padrão IUPAC.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	31.142	BP	0.0560	3.16858	7.10486e-1	43.00665
2	38.055	BB	0.0761	4.19907	6.88628e-1	56.99335
Totals :				7.36765	1.39911	

O conteúdo de estigmastadieno foi determinado aplicando-se a fórmula:

$$\text{mg / kg de estigmastadienos} = \frac{(\text{As} \times \text{Mc})}{(\text{Ac} \times \text{Mo})}$$

onde: As \Rightarrow área de pico de estigmastadieno;

Ac \Rightarrow área de pico do padrão interno (colestadieno);

Mc \Rightarrow peso do padrão adicionado, em microgramas;

Mo \Rightarrow peso da amostra analisada, em gramas.

$$\text{Assim: mg / kg de estigmastadienos} = \frac{(4.19907 \times 20)}{(3.16858 \times 1,0332)}$$

O resultado obtido aplicando-se esta fórmula foi de 25,6 mg de estigmastadieno por kg de azeite.

Analisando-se este resultado, pode-se perceber que o valor obtido está muito próximo do real, que é 25,4 mg/kg de estigmastadieno. Portanto, este valor é considerado satisfatório e sustenta as afirmações anteriores com relação à identificação do pico do estigmastadieno.

4.2.4.2. Procedimento Experimental

Realizou-se finalmente a análise de estigmastadieno que, neste trabalho, é uma das análises mais importantes. Sua relevância deve-se ao fato de que, no Brasil, até o momento não se têm conhecimento de nenhum Laboratório que execute esta análise como rotina.

O fundamento deste método é detectar o estigmasta-3,5-dieno, substância produzida pela desidratação do β -sitosterol que, nos casos mais desfavoráveis, permitem detectar a presença de óleos vegetais refinados ou de azeite de oliva refinado no azeite de oliva virgem em proporções de 1% ou inferior (LANZÓN; CERT, ALBI, 1989).

O azeite de oliva virgem, produzido pelo processo convencional (prensagem e centrifugação), não produz quantidade considerável de estigmastadienos ($< 0,01$ mg/kg), onde se estabelece o máximo de 0,15 mg/ kg na Legislação Européia. Em resíduo de óleo bruto de oliva são encontradas pequenas concentrações de estigmastadienos (entre 0,2 e 3 mg/kg), devido à aplicação de alta temperatura durante o processo de secagem do azeite de oliva (DOBARGANES; CERT; DIEFFENBACHER, 1999).

Os resultados da análise de estigmastadieno podem ser visualizados na Tabela 34.

Tabela 34. Valores de Estigmastadieno para Azeites de Oliva Extra Virgem e Virgem

Amostra	Estigmastadieno
Unión Europea (2003)	M 0,15 mg/ kg
A	0,05
B	<u>18,31</u>
C	< 0,03
D	0,06
E	<u>15,29</u>
F	0,05
G	<u>72,62</u>
H	0,06
I	0,03
J	< 0,03
K	0,07
L	<u>0,56</u>
M	0,04
N	0,05
O1	0,03
O2	< 0,03
P	<u>4,35</u>
Q	< 0,03
R	0,14
S	< 0,03
T	0,04
U	0,05
V	<u>0,96</u>
W	0,03
X	0,14
Y	0,15
Z	0,06
Aa	0,07
Bb	<u>0,19</u>
Cc	<u>0,85</u>

Valores em negrito e sublinhado: acima do limite máximo permitido por Legislação.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se perceber que 8 das 30 amostras analisadas apresentaram valores acima do limite permitido por Legislação, que é de 0,15 mg de estigmastadieno por kg de azeite.

Nesta análise, os resultados mais críticos são apresentados pelas amostras **B**, **E**, **G** e **P**. Por este motivo, serão apresentados aqui os cromatogramas destas 4 amostras. A Figura 21, a seguir, apresenta o cromatograma do padrão interno (colesta-3,5-dieno).

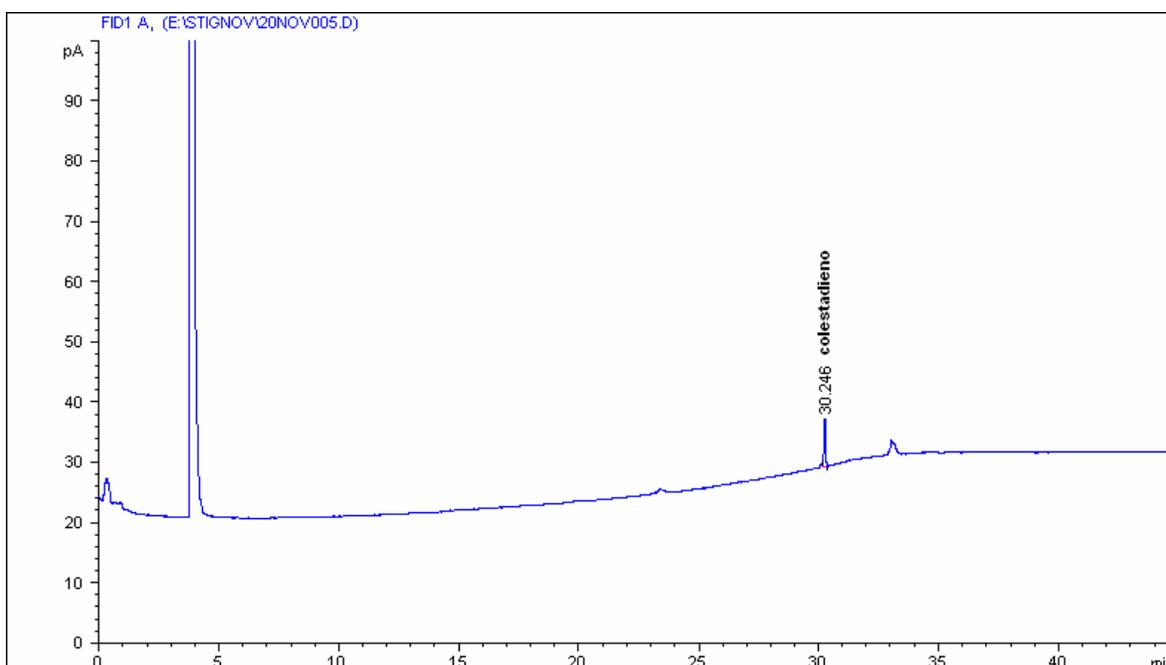


Figura 21. Cromatograma do padrão interno colesta-3,5-dieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

O cromatograma apresentado pela Figura 21 mostra o padrão interno (colesta-3,5-dieno) no tempo de retenção de 30,246 minutos. Este tempo, um pouco diferente daquele visualizado na Figura 18, mostra uma variação totalmente esperada, uma vez que a coluna capilar HP-5 foi tirada e recolocada várias vezes no cromatógrafo, o que justifica estas pequenas diferenças.

Nas Figuras 22 e 23 podem ser visualizados os cromatogramas das amostras **B** e **E**.

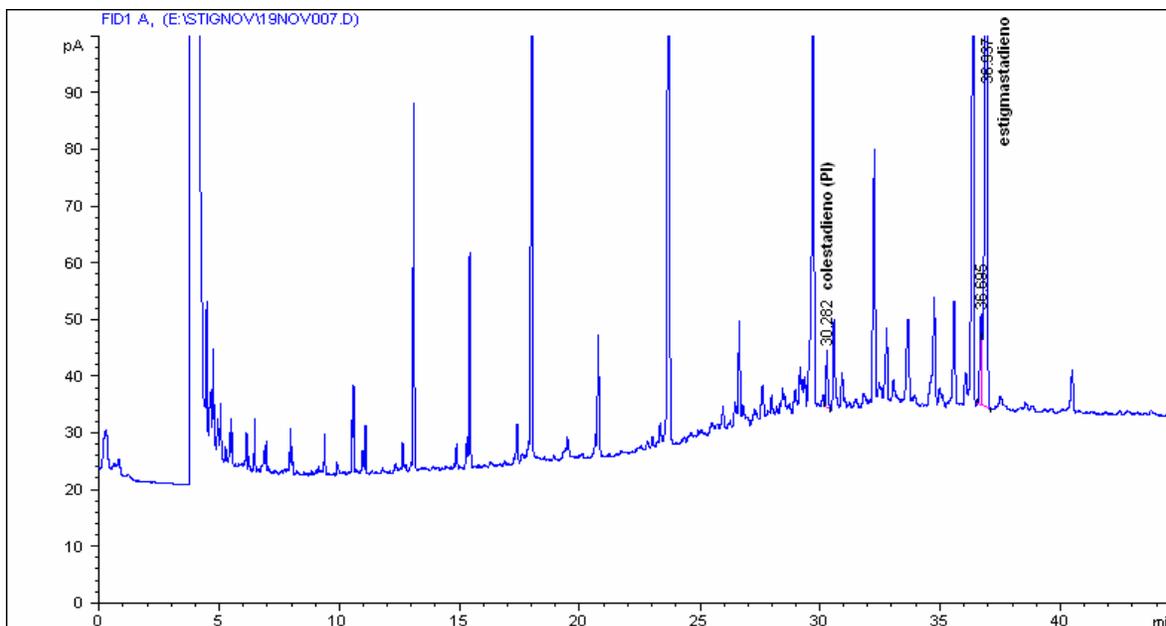


Figura 22. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra **B**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

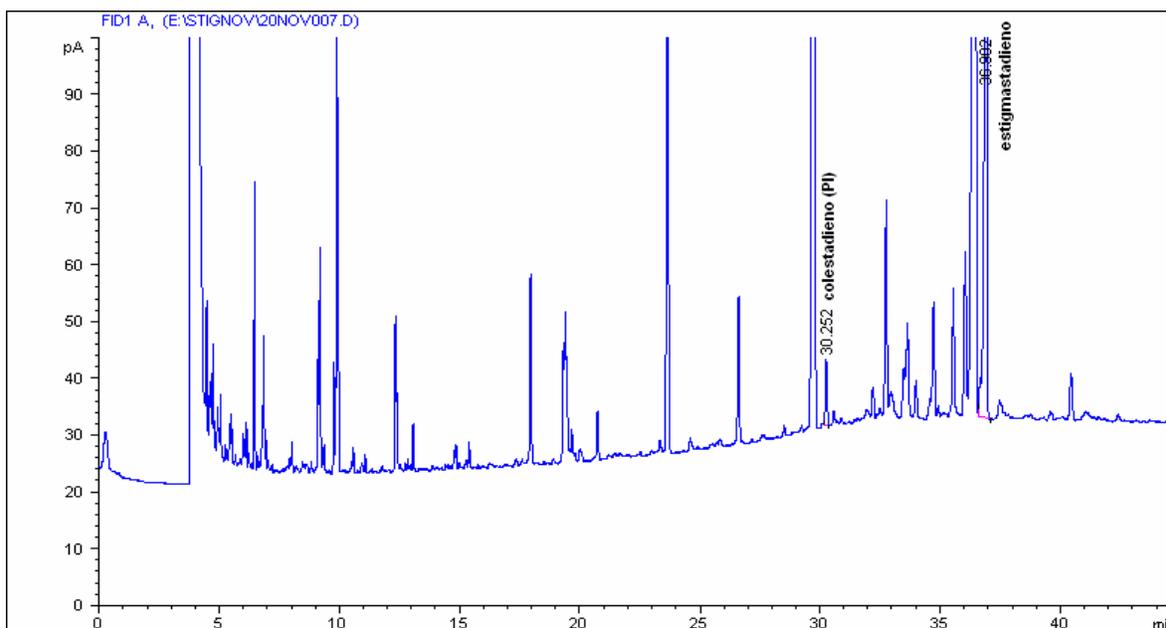


Figura 23. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra **E**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

Através destes resultados, pode-se perceber que novamente as amostras **B** e **E** são apresentadas com valores insatisfatórios, como já tem acontecido em outras análises. Para ambos os casos, as suspeitas de fraude se mantêm, sustentando ainda, a hipótese de adulteração com óleo de soja e óleo de girassol, respectivamente.

Cert *et al* (1994), analisaram os óleos de girassol, canola e soja refinados e observaram a presença do estigmastadieno na concentração de 2-85 mg/ kg de amostra. Desta forma, em comparação ao estudo apresentado pelos autores, é possível dizer que os resultados das amostras **B** e **E** são plausíveis e estão totalmente de acordo com os dados citados.

As Figuras 24 e 25, a seguir, mostram o cromatograma do padrão interno (colestadieno) e da amostra **G**, respectivamente.

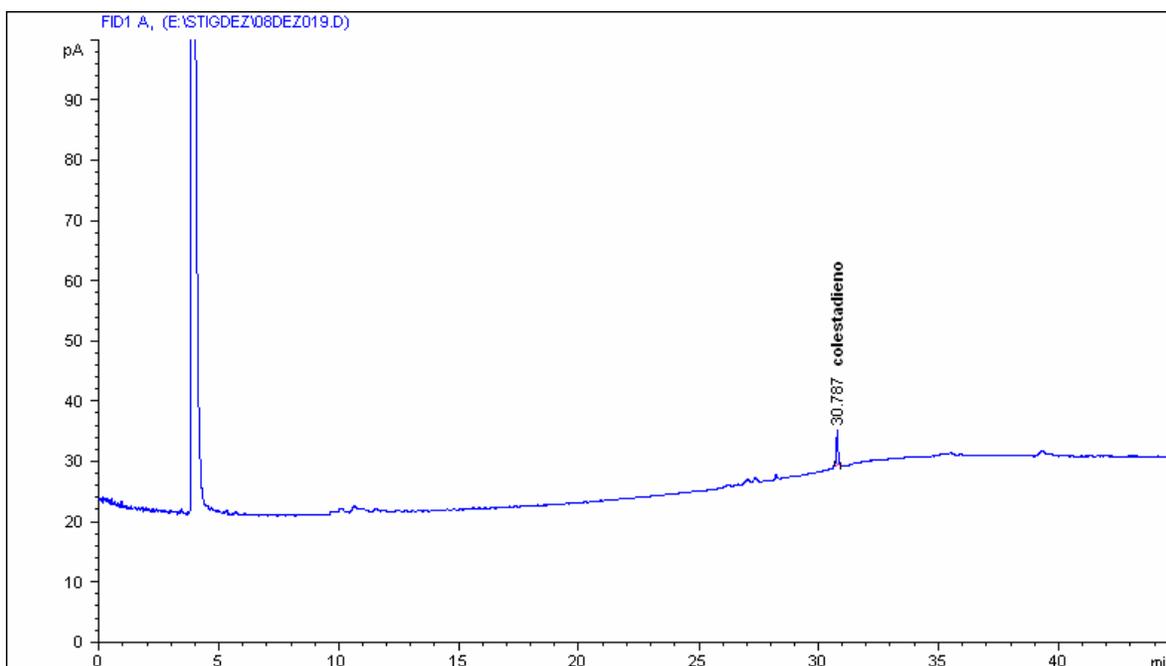


Figura 24. Cromatograma do padrão interno colestadieno injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

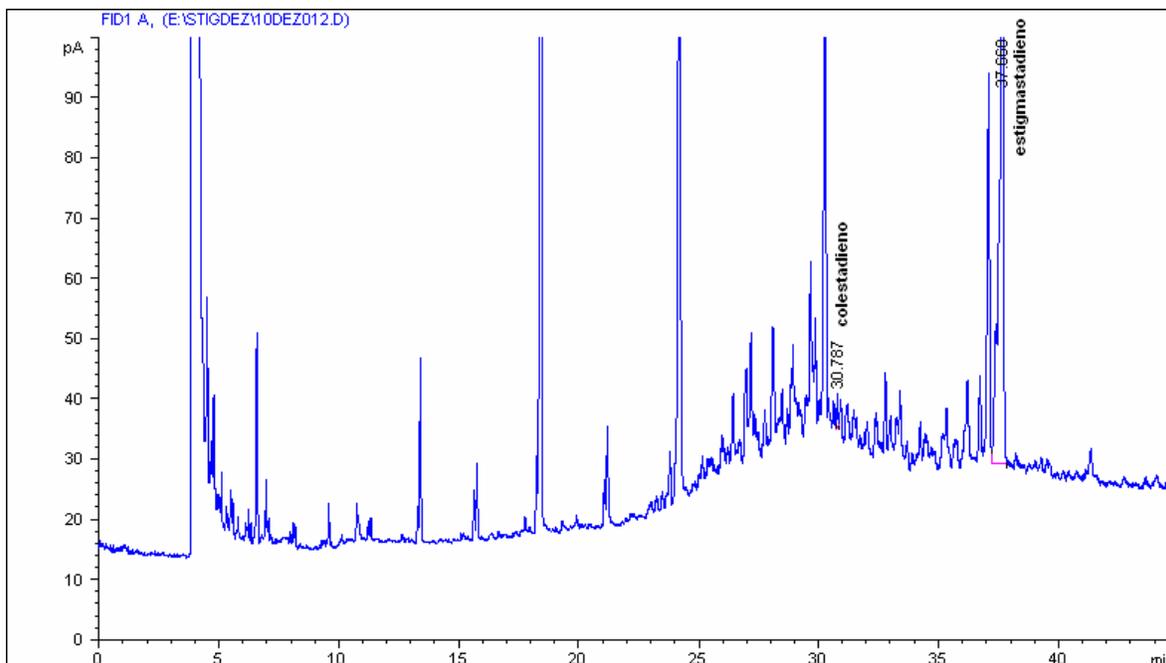


Figura 25. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra **G**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

Na Figura 24 pode-se visualizar o padrão interno (colestadieno) no tempo de retenção de 30,787 minutos. O tempo apresentado é um pouco diferente daquele visualizado nas Figuras 18 e 21, pelas mesmas razões já discutidas anteriormente.

A Figura 25, por sua vez, apresenta o padrão interno (colestadieno) no tempo de retenção de 30,787 minutos e o estigmastadieno, juntamente com o seu isômero, no tempo de 37,660 minutos. Esta figura, que mostra o resultado apresentado pela amostra **G**, é possível perceber um cromatograma bastante ruim e o pior resultado dentre todas as amostras. Isto justifica e sustenta, mais uma vez, a suspeita de adulteração com bagaço de oliva.

Segundo Cert e colaboradores (1994), o óleo de bagaço de oliva sem refinar geralmente tem uma coloração intensa bastante indesejável e, conseqüentemente, seu refino requer uma intensa clarificação, gerando, assim,

um óleo com um conteúdo muito alto de estigmastadieno. Os pesquisadores analisaram 20 amostras de cinco refinarias diferentes da Espanha, que mostraram uma alta concentração de estigmastadieno, variando de 7-200 mg de estigmastadieno por kg de amostra, embora a maioria dos valores (14 amostras) estivesse abaixo de 120 mg/kg.

Assim, pode-se afirmar que as suspeitas levantadas para esta amostra estão de acordo com a literatura. No entanto, vale lembrar que, apesar da fundamental importância desta análise, esta hipótese só poderá ser confirmada em conjunto com as outras análises realizadas.

O cromatograma obtido pela amostra **P** pode ser visualizado na Figura 26, a seguir, que apresenta o padrão interno (colesta-3,5-dieno) no tempo de retenção de 30,859 minutos e o estigmasta-3,5-dieno (e uma pequena quantidade do seu isômero) no tempo de 37,634 minutos.

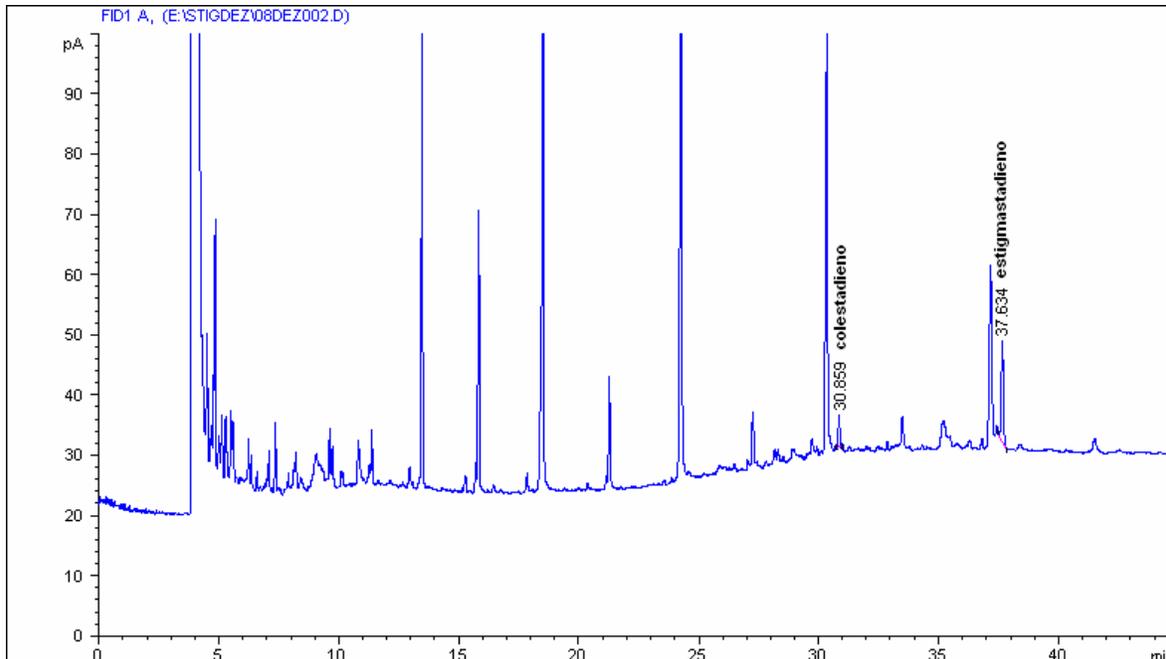


Figura 26. Cromatograma da análise de estigmastadieno da amostra **P**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

Analisando-se o cromatograma apresentado, pode-se perceber um resultado ruim para a amostra **P**. De acordo com o valor obtido, é possível suspeitar que este azeite seja adulterado com óleo de soja ou até mesmo com o próprio azeite de oliva refinado, baseando-se na literatura apresentada por Cert e colaboradores (1994) que aponta a presença de estigmastadieno na concentração de 2-85 mg/ kg em óleo de soja e de 2-100 mg/ kg em azeite de oliva refinado comercial.

As demais amostras, **L**, **V** e **Cc**, que também apresentaram valores de estigmastadieno acima do permitido por Legislação, sugerem fraude com azeite de oliva refinado. Esta hipótese é sustentada pelos resultados apresentados nas outras análises e, ainda, por terem apresentado valores parecidos, variando de 0,56 a 0,96 mg/kg.

Lanzón e outros (1989) analisaram 15 amostras de azeite de oliva refinado e encontraram o composto estigmasta-3,5-dieno em quantidades significativas, estando presente na concentração de 3-100 mg/ kg. Cert *et al* (1994) também relatam uma quantidade de estigmastadieno muito parecida em azeites de oliva refinados comercial, variando de 2-100 mg de estigmastadieno por kg de amostra.

Por outro lado, Dobarganes e colaboradores (1999), relatam que dependendo das condições aplicadas durante o processo de refino, o azeite de oliva refinado comercial pode apresentar concentrações de 1-29 mg de estigmastadieno por kg de amostra.

Cert *et al* (1994), justificam a considerável diferença encontrada no conteúdo de estigmastadieno dos óleos comerciais, explicando que a clarificação é uma etapa que aumenta consideravelmente a quantidade de estigmastadieno.

No refino químico ocorre, primeiramente, a desacidificação parcial do óleo com hidróxido de sódio sem que haja produção considerável de estigmastadieno, seguido da clarificação, que utiliza baixos teores de terra clarificante e temperaturas brandas (60-70°C), produzindo baixa concentração do composto. Entretanto, no refino físico, não se executa a desacidificação, e a clarificação ocorre mediante um processo que utiliza maiores teores de terras clarificantes e um maior tempo de contato, sob altas temperaturas (>90°C), implicando em uma maior produção de estigmastadieno. Os autores quantificaram o estigmastadieno de amostras obtidas em diversas refinarias da Espanha, sob as condições usuais de operação, e foram encontrados na escala de 2-10 mg/ kg nos óleos refinados quimicamente e na ordem de 15-45 mg/ kg para os refinados fisicamente.

Por fim, deve-se discutir o resultado apresentado pela amostra **Bb**, que ficou bastante próximo ao limite máximo estabelecido pela Legislação. O valor obtido mostrou um comportamento um pouco diferente das outras amostras analisadas. Enquanto as demais amostras adulteradas apresentaram valores de estigmastadieno acima de 0,55 mg/ kg, a amostra **Bb** ficou na ordem de 0,19 mg/ kg. Este resultado confirma a fraude com óleo vegetal refinado, e sugere a adulteração com uma pequena quantidade de óleo de soja, como já foi suspeitado anteriormente. Cert e outros (1994), quantificaram o estigmastadieno em óleo de soja e o encontraram na concentração de 2-85 mg/ kg. Desta forma, a hipótese levantada é coerente com a literatura.

4.2.5. Quantificação de Esteróis

Com o intuito de complementar esta pesquisa e, principalmente, reunir mais argumentos às suspeitas de fraude já relatadas, realizou-se, por fim, a análise de esteróis. No entanto, por não ser o objetivo principal deste trabalho e, fundamentalmente, por se tratar de uma análise muito trabalhosa e onerosa, foram

selecionadas apenas as amostras que, hipoteticamente, são adulteradas. A quantificação de esteróis pode não só confirmar as suspeitas já levantadas, mas também sustentar hipóteses que tenham sido tomadas como verdade.

A determinação de esteróis é uma das técnicas mais empregadas na detecção de adulterações em 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 glicéridica são ferramentas úteis para a detecção de óleos tratados para conter baixo teor de esteróis (TRUJILLO-QUIJANO & COSTA, 1995).

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 β -sitosterol.

A identificação dos componentes foi realizada mediante comparação com o tempo de retenção dos padrões injetados em mistura (Figura 27) e os resultados foram obtidos a partir da auto integração realizada com a utilização do software Agilent ChemStation Plus, versão A.08xx, em conjunto com o cromatógrafo marca CGC Agilent 6850 Series GC System, detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano). A Tabela 35, visualizada a seguir, mostra as amostras submetidas à análise de esteróis.

Tabela 35. Valores de Esteróis para Azeites de Oliva Extra Virgem

<i>Amostra</i>	<i>β-sitosterol</i>	<i>Campesterol</i>	<i>Estigmasterol</i>	<i>Colesterol</i>	<i>Outros</i>	<i>Esteróis Totais</i>
Unión Europea (2003)	m 93	M 4,0	< campesterol	M 0,5	-	m 1000
B	<u>83,71</u>	<u>7,97</u>	5,37	-	2,96	<u>2.167</u>
E	<u>67,03</u>	<u>8,54</u>	6,49	0,43	<u>17,52</u>	<u>2.538</u>
G	94,06	3,48	1,68	-	0,78	<u>3.543</u>
L	95,58	3,62	0,80	-	-	1.438
P	<u>92,54</u>	<u>4,35</u>	1,37	0,23	1,51	<u>1.874</u>
R	95,74	3,50	0,76	-	-	1.515
S	95,38	3,94	0,69	-	-	1.659
V	93,91	2,67	0,78	<u>0,81</u>	1,84	1.429
X	96,33	2,77	0,91	-	-	1.446
Bb	<u>92,77</u>	<u>5,02</u>	1,37	-	0,84	<u>1.972</u>
Cc	95,38	3,94	0,68	-	-	1.566

Valores em negrito e sublinhado: não condiz com o limite permitido por Legislação.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 35, pode-se perceber que a quantificação de esteróis indica fraude em 5 amostras de azeite de oliva, das 11 analisadas.

As amostras **B** e **E** foram as que apresentaram os piores valores para os esteróis β -sitosterol, campesterol e estigmasterol e, por este motivo, seus cromatogramas serão apresentados mais adiante.

A Figura 27, a seguir, mostra o cromatograma obtido de uma mistura de padrões de esteróis, contendo colesterol, diidrocolesterol, campesterol, estigmasterol e β -sitosterol.

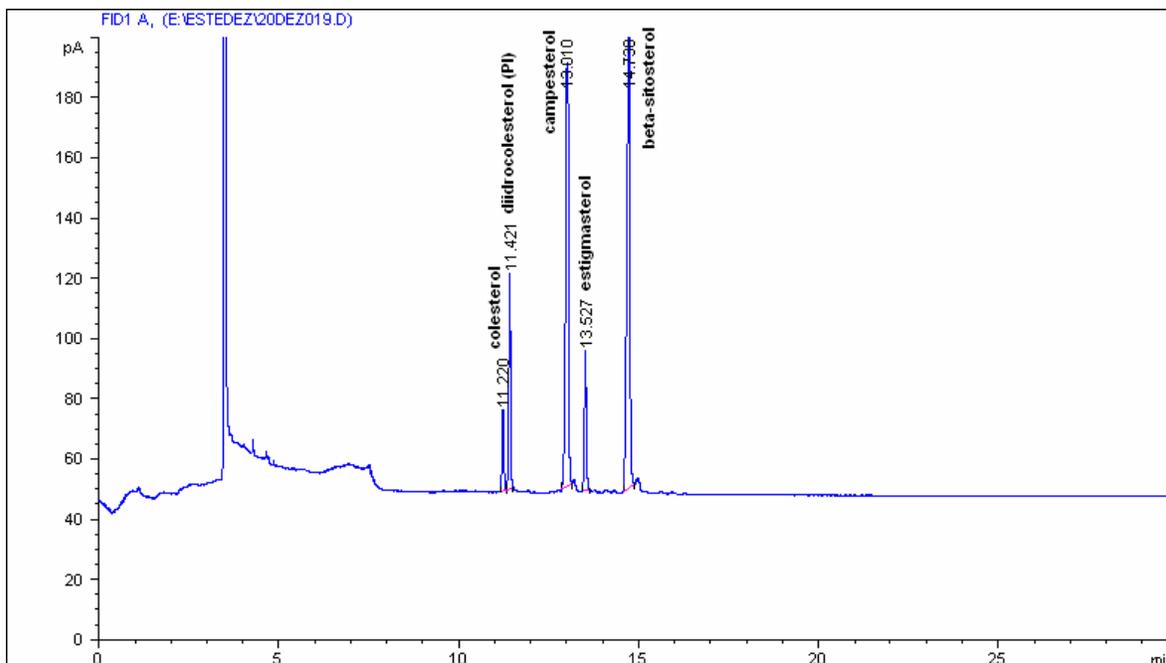


Figura 27. Cromatograma da mistura de padrões de esteróis, injetado na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

De acordo com a Resolução da União Europeia (2003), o perfil de esteróis para as nove categorias de azeite de oliva deve obedecer às porcentagens: menor que 0,5% para o colesterol, menor que 0,1% para brassicasterol, mínimo de 93% de β -sitosterol (que inclui a soma dos esteróis Δ 5,23-estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol e Δ 5,24-estigmastadienol), máximo de 4% para campesterol, menor que o campesterol para o estigmasterol e menor que 0,5% para Δ 7-estigmastenol, além do conteúdo de esteróis totais de no mínimo 1000 mg/kg para a maioria dos azeites e no mínimo 1800 mg/kg para o azeite de bagaço de oliva refinado.

A Legislação Brasileira vigente, Resolução da ANVISA, RDC nº 270, recomenda que a composição esterólica do azeite de oliva siga os parâmetros estabelecidos pelo Codex Alimentarius (FAO/OMS) – Stan 33 (2003), que são os mesmos vigentes na Legislação Européia, e também contidos na antiga Resolução RDC nº 482 da ANVISA, revogada em 22 de setembro de 2005.

O cromatograma obtido pela amostra **B** na quantificação esterólica pode ser visualizado a seguir, na Figura 28.

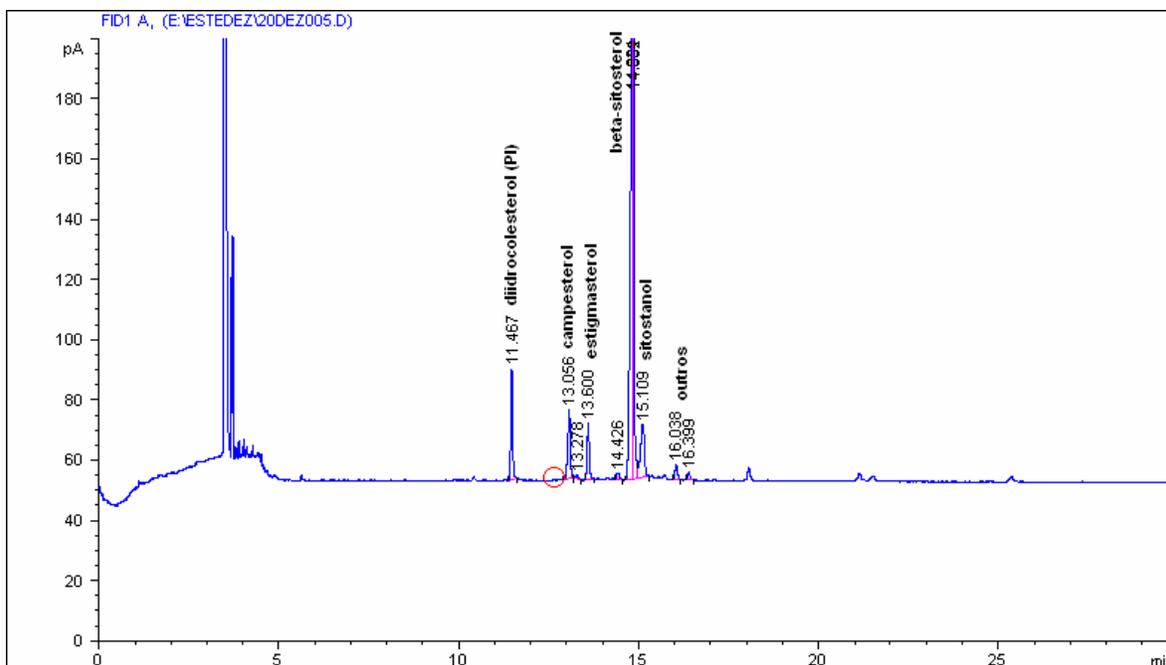


Figura 28. Cromatograma da análise de esteróis da amostra **B**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 35 é possível afirmar que a amostra **B** é, certamente, adulterada com algum óleo vegetal, que não o oliva refinado. A suspeita de fraude com óleo de soja permanece, pois a quantidade de esteróis está fora do estabelecido pela Legislação (valor menor que 93% para o β -sitosterol e maior que 4% para o campesterol) e, também, pelo valor acima do esperado para os esteróis totais.

Fernández San Juan (1991) relata que o óleo de soja tem uma composição em esteróis caracterizada por β -sitosterol (54,3-56,1%), campesterol (19,6-23,0%) e estigmasterol (18,1-19,8%). Estes valores, juntamente com o cromatograma apresentado na Figura 28, esclarecem, definitivamente, que a amostra **B** não é adulterada com óleo de canola (como se suspeitou

anteriormente) devido à ausência do brassicasterol e, ainda, sustenta a hipótese de fraude com óleo de soja.

A seguir, a Figura 29 mostra o cromatograma obtido pela amostra **E**.

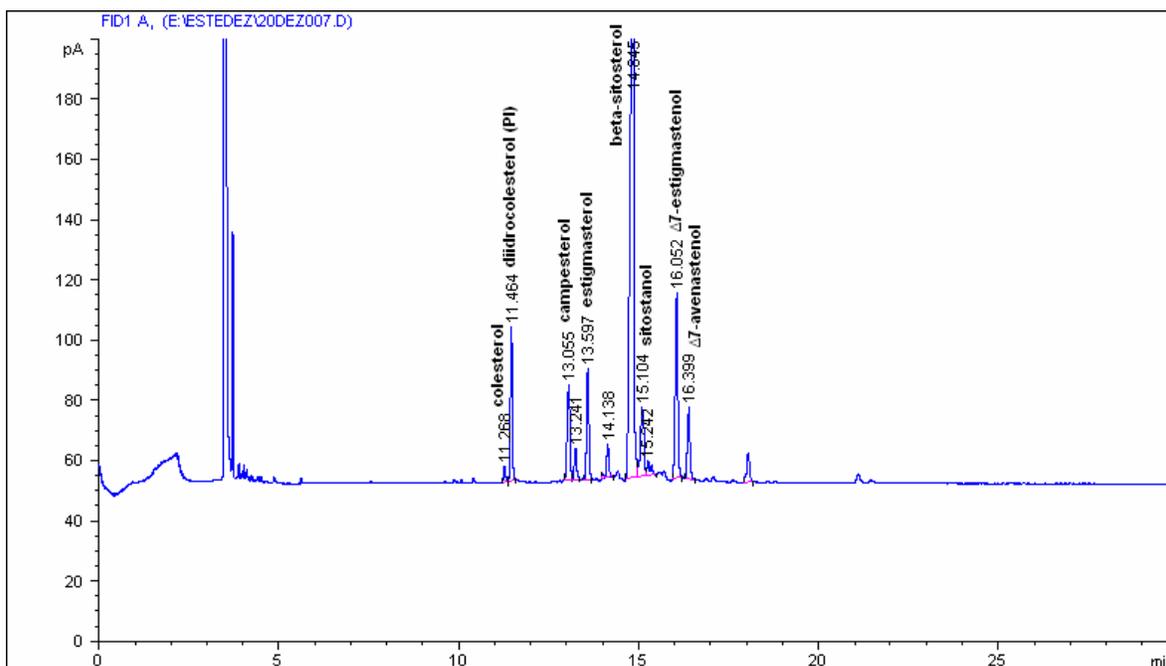


Figura 29. Cromatograma da análise de esteróis da amostra **E**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

A amostra **E** apresenta resultados ainda piores que a amostra anterior. Assim como a amostra **B**, esta também apresenta valores de β -sitosterol, campesterol e estigmasterol fora do limite estabelecido por Legislação. Além disso, deve-se destacar que este azeite possui um valor muito alto dos esteróis Δ 7-estigmastenol e Δ 7-avenastenol.

Desde o início das análises suspeita-se que a amostra **E** é adulterada com óleo de girassol normal, e esta hipótese vem se confirmando desde a composição

em ácidos graxos. Segundo Arturo Cert *, esta mistura pode ser detectada através da quantificação de $\Delta 7$ -estigmastenol, em níveis de 2-3% de adição.

Aparicio e Aparício-Ruíz (2000) relatam que o óleo de girassol normal apresenta uma porcentagem de $\Delta 7$ -estigmastenol que varia de 7 a 13%, e pode ajudar a detectar este óleo no caso de mistura com outros óleos vegetais, como o azeite de oliva, por exemplo. Além disso, o autor enfatiza que, no caso de fraude com óleo de girassol normal em um nível acima de 5%, pode ser detectado um aumento de campesterol e estigmasterol a níveis de 7 a 13% e 8 a 11%, respectivamente.

Analisando-se o cromatograma obtido pela amostra **E** (Figura 29) e seus tempos de retenção, e comparando-os com um quadro de esteróis disponível na Resolução da Unión Europea (2003), pode-se concluir que os esteróis aqui denominados como “outros” são, respectivamente, os esteróis $\Delta 7$ -estigmastenol e $\Delta 7$ -avenastenol.

Desta maneira, a amostra **E** apresenta, isoladamente, 12,80% do esterol $\Delta 7$ -estigmastenol, confirmando, então, que esta amostra realmente é adulterada com óleo de girassol normal. Os resultados de esteróis deste azeite mostram, ainda, um valor bastante alto para os esteróis totais.

De todas as amostras analisadas quanto à composição de esteróis, apenas uma apresentou um comportamento diferente. Foi a amostra **G** que, de acordo com a Tabela 35, mostrou todos os esteróis dentro do parâmetro requerido para azeites de oliva, mas, por outro lado, apresentou um valor extremamente alto para esteróis totais, o que confirma a fraude deste azeite com bagaço de oliva.

* CERT, Arturo. **Instituto de la Grasa**. Sevilla, Spain. [mensagem pessoal]

As demais amostras, **P** e **Bb**, apresentaram valores muito próximos ao mínimo estabelecido para o β -sitosterol, valores superiores para o campesterol e relativamente altos para esteróis totais. Tais amostras provavelmente foram adulteradas com óleo de soja, ou então com uma mistura de óleos, de maneira a não alterar bruscamente a quantidade de esteróis.

No caso da amostra **Bb**, em análises anteriores foi levantada a suspeita de fraude deste azeite com óleo de soja ou de canola. Para esclarecer possíveis dúvidas, o cromatograma desta amostra também foi incluído, e se encontra a seguir, na Figura 30.

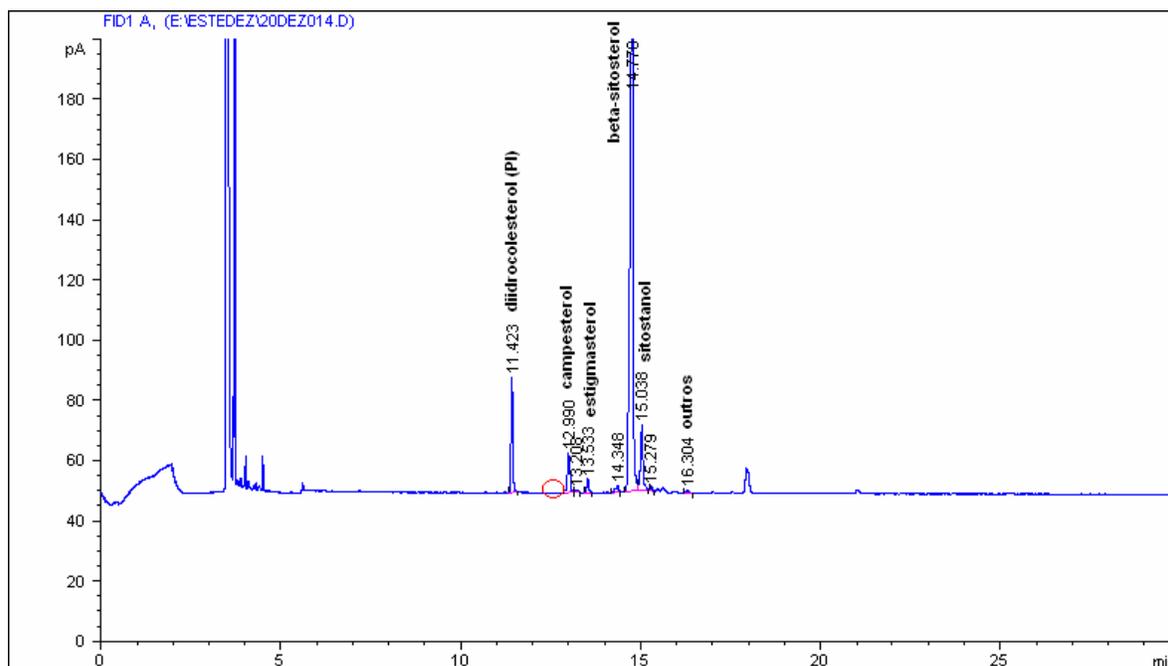


Figura 30. Cromatograma da análise de esteróis da amostra **Bb**, injetada na coluna HP-5 Agilent (5% difenil 95% dimetil polisiloxano).

De acordo com o cromatograma da amostra **Bb**, pode-se perceber que, assim como aconteceu para a amostra **B**, neste azeite também não há a presença do brassicasterol e, conseqüentemente, esta amostra não foi adulterada com óleo

de canola. Por isso, a suspeita de fraude com óleo de soja ou uma mistura de óleos permanece, como relatado anteriormente.

Ainda analisando-se a Tabela 35, pode-se perceber que as outras 6 amostras, **L**, **R**, **S**, **V**, **X** e **Cc**, apresentaram valores de esteróis dentro dos limites estabelecidos por Legislação, exceto o teor de colesterol da amostra **V**, que está acima do limite máximo permitido. De fato, todas as amostras citadas são azeite de oliva, não havendo, desta maneira, fraude com outros óleos vegetais.

No entanto, das 6 amostras citadas, três delas já foram apontadas, em análises anteriores, como amostra adulterada. Isto significa dizer que, através da análise de esteróis, confirma-se que as amostras **L**, **V** e **Cc** foram fraudadas com azeite de oliva refinado, uma vez que as 3 amostras apresentaram resultados totalmente dentro dos parâmetros exigidos pela Legislação.

Por outro lado, 3 amostras, codificadas como **R**, **S**, e **X**, mostraram que não são adulteradas com nenhum tipo de óleo vegetal, contendo, unicamente, azeite de oliva extra virgem. Este resultado já era esperado, levando-se em consideração os resultados das análises realizadas anteriormente.

Na literatura, Becker e colaboradores (2005) analisaram 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 eram procedentes da Argentina, Espanha, Itália e Portugal. As amostras foram avaliadas quanto a sua composição em esteróis e o resultado do percentual dos principais esteróis mostrou que é possível detectar fraude no azeite de oliva com outros óleos vegetais, em função do teor de β -sitosterol que deve ser no mínimo 93%, segundo as Legislações vigentes. Através do teor de esteróis totais, associado à composição em esteróis, foi possível detectar adulteração em três marcas de azeite, das 25 analisadas.

Peixoto e outros (1998) também estudaram a composição em esteróis de 10 amostras de azeite de oliva, sendo 5 amostras nacionais (envasadas no Brasil) e 5 amostras importadas (envasadas no país de origem). Os resultados apresentados mostraram que nenhuma amostra envasada no Brasil atendeu aos limites de esteróis estabelecidos pelo Codex Alimentarius e pela Legislação Européia, pois o principal esterol do azeite de oliva, o β -sitosterol, apresentou uma variação de 61,2 a 76,6%, valores estes muito inferior ao mínimo exigido. O campesterol também ultrapassou o limite máximo permitido, variando de 13,3 a 22,2%. No entanto, todas as amostras importadas apresentaram os principais esteróis dentro dos limites estabelecidos por Legislação, mostrando uma composição compatível com azeite de oliva.

Como já citado, o óleo de soja tem uma composição em esteróis caracterizada por β -sitosterol (54,3-56,1%), campesterol (19,6-23,0%) e estigmasterol (18,1-19,8%) e, para o azeite de oliva, os principais esteróis são β -sitosterol (93,5-95,7%), campesterol (2,3-4,0%) e estigmasterol (1,5-2,6%). Assim, no estudo conduzido por Peixoto *et al* (1998), os resultados encontrados nas amostras nacionais mostraram que, provavelmente, todas as amostras foram adulteradas com óleo de soja, por ser um óleo de baixo valor comercial e com grande produção.

De um modo geral, os resultados apresentados no presente trabalho, corroboram os apresentados na literatura e mostram que o azeite envasado no Brasil está sendo adulterado. Das três amostras envasadas no Brasil analisadas neste trabalho, todas eram fraudadas e, como agente adulterante, foram encontrados o óleo de soja e o próprio azeite de oliva refinado. Essa conclusão já havia sido mostrada em um trabalho feito pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor – IDEC (1995), que analisou 18 amostras (14 importadas e 4 nacionais) de azeite de oliva. Os parâmetros utilizados foram a composição em

ácidos graxos e a composição em esteróis, e os resultados mostraram que três amostras nacionais estavam adulteradas com outros óleos vegetais.

A PRO TESTE – Associação Brasileira de Defesa do Consumidor, publicou recentemente (maio de 2007) em sua Revista PRO TESTE uma reportagem que confirma a adulteração de algumas marcas de azeite de oliva extra virgem comercializados no Brasil. Foram testadas 20 amostras de azeite de oliva extra virgem, e as análises realizadas foram de: rotulagem, embalagem, acidez, índice de peróxido, análise espectrofotométrica em ultravioleta K 270 nm, K 232 nm e delta K, quantificação de ceras, estigmastadieno, eritrodiol e uvaol, composição em ácidos graxos e esteróis, isômeros transoléicos, translinoléicos, translinolênicos e ECN42, além da análise sensorial. Dentre as amostras analisadas, duas estavam fraudadas, sendo uma delas provavelmente adulterada com soja e, a outra, com o próprio azeite de oliva refinado. A avaliação com certeza foi realizada no exterior.

Esta atual publicação se mostrou bastante completa e condizente com a caracterização imposta pelo Codex Alimentarius para se identificar a adulteração de azeites de oliva extra virgem.

Assim, é possível notar que o assunto desenvolvido neste trabalho é bastante atual e de grande interesse social, uma vez que a fraude destes azeites irá lesar o consumidor que porventura adquirir o produto. Vale ainda fazer um alerta aos principais órgãos nacionais de fiscalização e controle de qualidade, para que estejam constantemente analisando este produto, a fim de se controlar de forma mais adequada os azeites de oliva comercializados nacionalmente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação às metodologias executadas:

- Ácidos Graxos Livres e Índice de Peróxido: são análises físico-químicas fundamentais para se obter a caracterização dos azeites de oliva. Os resultados sugerem as condições em que os azeites foram produzidos e armazenados mediante a liberação de ácidos livres e a autooxidação enzimática, respectivamente. São importantes critérios de qualidade, mas não são capazes de indicar a adulteração de azeites de oliva.

Das 30 marcas analisadas, apenas três sugerem o estado crítico da conservação dos azeites.

- Coeficiente de Extinção Específica: a análise espectrofotométrica do azeite de oliva no ultravioleta pode fornecer informações sobre a sua identidade, seu estado de conservação e mudanças causadas por processamento. Esta análise é capaz de indicar adições fraudulentas de óleo vegetal refinado ao azeite de oliva virgem, mas não identifica qual é o agente adulterante.

Das 30 amostras, pode-se detectar adulteração em apenas quatro amostras. Isto mostra que a extinção específica também é relativamente limitada, pois permitiu somente a detecção de amostras grosseiramente adulteradas. No entanto, o valor de ΔK se mostrou muito importante no julgamento das adulterações e capaz de indicar fraudes de amostras que foram confirmadas por outras análises.

- Composição em Ácidos Graxos: esta é uma das principais análises utilizadas na detecção de adulterantes no azeite. A composição em ácidos graxos é tradicionalmente utilizada pela indústria de alimentos como indicativo de

pureza de azeites de oliva, mas devido às amplas margens e variabilidade em sua composição, alguns tipos de contaminação não podem ser detectadas. No entanto, dependendo do caso, pode-se, ao menos, dar o indício da presença de misturas. Este parâmetro é utilizado, principalmente, para detectar as fraudes mais grosseiras, mas não é suficiente para assegurar a identidade dos azeites de oliva.

Das 30 amostras analisadas, somente uma amostra se apresentou não conforme. Apesar da importância da composição em ácidos graxos, as fraudes de azeites de oliva virgem com azeites de oliva refinados não podem ser identificados por esta metodologia.

- Isômeros *Trans*: a presença de isômeros *trans* oléicos, linoléicos e linolênicos em azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva, acima dos níveis máximos, pode indicar principalmente a adulteração com óleos de grãos insaturados refinados, ou hidrogenados, azeite de oliva esterificado, azeite de oliva virgem tratado ilegalmente, ou óleos geneticamente modificados ou desesterolizados a altas temperaturas.

Das 30 amostras, pode-se detectar a adulteração em quatro amostras. Isto mostra que este parâmetro é capaz de detectar alguns tipos de fraude, mas não a adulteração da maioria dos azeites.

- Índice de Iodo e Saponificação Calculados: o índice de iodo é uma medida de insaturação de um óleo ou gordura, e pode ser determinado a partir das porcentagens relativas dos ácidos graxos insaturados que constituem o óleo em estudo.

Das 30 marcas, apenas um azeite apresentou o índice de iodo fora do limite estabelecido por Legislação e demonstrou ser grosseiramente adulterada.

- Determinação da Diferença do ECN42 Experimental e Teórico: a metodologia que determina o grupo equivalente ao peso molecular 42 (ECN42) é eficaz na detecção de fraudes de azeites de oliva pela adição de outros óleos de sementes oleaginosas, mas nem sempre é capaz de prever se um azeite de oliva virgem é adulterado com azeite de oliva refinado ou resíduo do mesmo.

Das 30 marcas analisadas, foi possível detectar a adulteração de 6 azeites. Os resultados obtidos mostraram que dois azeites foram fraudados com um óleo vegetal de composição bastante diferente do azeite de oliva.

- Quantificação de Estigmastadienos: esta metodologia é especialmente adequada para detectar a presença de azeites vegetais refinados (azeites de oliva, bagaço de oliva, girassol, palma, etc) em azeites de oliva virgem, uma vez que os azeites refinados contêm estigmastadienos e os azeites virgens não os contêm.

Oito das 30 amostras analisadas apresentaram valores acima do limite permitido por Legislação. Dentre todas as análises realizadas, a de estigmastadienos é a mais eficaz na detecção de fraudes em azeites de oliva, embora não possa identificar, com certeza, qual é o agente adulterante.

- Quantificação de Esteróis: a determinação de esteróis é uma das técnicas mais empregadas na detecção de azeites de oliva. É um parâmetro importante para auxiliar na identificação de adulteração em azeite de oliva.

O azeite de oliva apresenta composição esterólica bastante particular, que tem sido utilizada para detectar a fraude com outros óleos. Entretanto, os trabalhos realizados no Brasil para a avaliação da qualidade ou adulteração do azeite de oliva normalmente não apresentam a quantificação em esteróis, provavelmente por se tratar de uma análise longa e de alto custo.

A análise de esteróis foi capaz de detectar fraude em 5 amostras de azeite de oliva, das 11 analisadas. A metodologia aplicada se mostrou eficiente na detecção de adulteração com outros óleos vegetais, que não o azeite de oliva refinado.

Entretanto, levando-se em consideração as outras análises realizadas para as amostras de maneira geral, foi possível identificar que outras 3 amostras também eram adulteradas e, desta vez, com o azeite de oliva refinado. Desta maneira, é importante dizer que a quantificação em esteróis é uma técnica bastante precisa na avaliação de pureza e qualidade do azeite de oliva, mas, isoladamente, não é capaz de detectar fraudes quando o agente adulterante é o azeite de oliva refinado.

E em relação às amostras analisadas, a Tabela 36 apresenta um resumo das amostras não conformes com as Legislações aplicadas a cada análise. Maiores informações, vide Anexo 1.

Tabela 36. Resultados analíticos de amostras não conformes com a Legislação vigente para cada análise.

Amostra	AGL	IP	K232	K270	Delta K	Comp. AG	Isom. Trans	ECN42	Estigmastadieno	Comp. Esteróis
B	—	—	NC	NC	NC	—	NC	NC	NC	NC
E	—	—	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
G	—	—	NC	NC	NC	—	NC	NC	NC	NC
L	—	NC	—	—	—	—	—	NC	NC	—
P	—	—	—	—	—	—	—	NC	NC	NC
V	NC	—	—	—	NC	—	NC	—	NC	—
Bb	NC	—	NC	NC	NC	—	—	NC	NC	NC
Cc	—	—	—	—	—	—	—	—	NC	—

NC – Resultado não conforme, de acordo com os as Legislações aplicadas a cada análise.

- As amostras que não foram citadas aqui estão completamente de acordo com a categoria declarada em seus rótulos, sendo denominadas, verdadeiramente, como azeite de oliva extra virgem ou virgem.

6. CONCLUSÕES

- 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 na avaliação de pureza e qualidade do azeite de oliva, torna-se comum a adulteração deste produto com outros óleos vegetais, ou com azeite de oliva de qualidade inferior.
- De acordo com as observações discutidas neste trabalho, pode-se concluir que, de todas as metodologias executadas, particularmente três delas foram fundamentais para a detecção da adulteração das amostras **P** e **Bb**. Foram as análises de ECN42, quantificação de estigmastadieno e perfil de esteróis.
- A análise da fração insaponificável é muito útil para detectar adulterações do azeite de oliva com outros óleos vegetais, como comprovado através das metodologias de estigmastadieno e esteróis.
- O estigmastadieno é um composto quimicamente estável, mesmo sob longos períodos de estocagem, extrema iluminação e péssimas condições de oxidação do azeite. Por este motivo, quando encontrado em amostras comerciais de azeite de oliva virgem, é devido, certamente, à manipulação ou contaminação acidental com óleos vegetais refinados.
- A taxa de estigmastadieno permite não somente a identificação da presença de um azeite de oliva tratado termicamente, mas também detecta menores quantidades de óleos vegetais refinados no azeite de oliva virgem. No entanto, apesar de detectar quantitativamente a fraude dos azeites, a análise de estigmastadieno não é capaz de confirmar qual é o agente adulterante e, principalmente, definir em qual proporção o óleo está presente.

- A aplicação das técnicas analíticas na avaliação da qualidade e da legitimidade dos azeites de oliva comercializados no Brasil são parâmetros de interesse principalmente para os órgãos de vigilância, pois todo o azeite consumido no país é importado da Europa ou da Argentina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, J.; IZQUIERDO, J. R.; GUTIÉRREZ, F. Aceite de oliva virgen. **Análisis sensorial**. Ed. Agrícola Española, S.A. Madrid, 1997.

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, p. 32 – 43, 1998.

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Brasília, nº 3029, 2005.

AOCS – American Oil Chemists Society. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign, 2004.

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

ASOLIVA. **Associação Espanhola da Indústria e Comércio Exportador de Azeite de Oliva**. Disponível em: <www.azeite.com.br>. Acesso em 12 mar. 2007.

ASSMANN, G.; WAHRBURG, U. **Health effects of the minor components of olive oil**. Disponível em: <<http://www.food-info.net/uk/products/olive/olive05.htm>>. Acesso em 10 mai. 2007.

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

AUED-PIMENTEL, S.; CARVALHO, J. B.; BADOLATO, E. S. G.; RODRIGUES, R. S. M. Monitoramento da qualidade de azeite de oliva comercializados na cidade de São Paulo. In: 6º Congresso e Exposição Latino-americano sobre Processamento de Óleos e Gorduras. Campinas, 1995.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; MINAZZI-RODRIGUES, R. S.; BADOLATO, E. S. G. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 61, n. 2, p. 69 – 75, 2002.

BECKER, D. F. S. **Quantificação de fitosteróis em azeite de oliva (*Olea Europaea*) por cromatografia em fase gasosa**. 2004. 128p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BECKER, D. F. S.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; FERNANDES, G.B. Quantificação de fitosteróis em azeite de oliva importados e disponíveis no comércio de Campinas utilizando cromatografia em fase gasosa. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 8, n. 3, p. 190 – 199, 2005.

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 of Agricultural Food Chemistry**. Easton, v. 46, p. 3153 – 3157, 1998.

BONVEHÍ, J. S.; TORRENTÓ, M. S.; COLL, F. V. A laboratory study of the bleaching process in stigmasta-3,5-diene concentration in olive oils. **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.

BOSKOU, D. **Olive oil: chemistry and technology**. AOCS Press, Champaign, IL, 1996, 161 p.

BOTELHO, C. A. V. A. **Resposta Técnica – Oliveira: Cultivo da Oliveira**. Disque Tecnologia – Coordenadoria Executiva de Cooperação Universitária e de Atividades Especiais da Universidade de São Paulo (CECAE/USP). 2006. Disponível em: <<http://sbirt.ibict.br/upload/sbirt2046.pdf>>. Acesso em 16 abr. 2007.

CASAS, J. J. S.; BUENO, E. O.; GARCÍA, A. M. M.; CANO, M. M. Estudio del contenido em ácidos grasos de aceites monovarietales elaborados a partir de aceitunas producidas em la región extremeña. **Grasas y Aceites**. Sevilla, v. 54, n. 4, p. 371 – 377, 2003.

CERT, A.; LANZÓN, A.; CARELLI, A. A.; ALBI, T. Formation of stigmasta-2,5-diene in vegetable oils. **Food Chemistry**. Oxford, v. 49, p. 287 – 293, 1994.

CERT, A. Normativa Internacional 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.; 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.

CIMATO, A. La calidad del aceite de oliva virgen y los factores agronômicos. **Olivae**. v. 31, p. 20 – 31, 1990.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils**. Codex Stan 33 – 1981. Revisado em fev. 2003.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. **Criação de um modelo agrícola sustentável para a Europa através da PAC reformada – os sectores do tabaco, do azeite, do algodão e do açúcar**. Bruxelas, 2003. Disponível em: <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/sugar/index_pt.htm>. Acesso em 28 set. 2005.

CORTESI, N.; ROVELLINI, P.; FEDELI, E. I trigliceridi oli naturali. Nota 1. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. Milano, v. 67, p. 69 – 73, 1990.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura – Os Ácidos Graxos**. Barueri. 2002. 580 p.

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

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the antioxidation of oils in the dark. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. **Journal of American Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 62, n. 9, p. 1387 – 1390, 1985.

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Pesquisa da EPAMIG garante produção de azeitonas.** 2005. Disponível em: <http://www.epamig.br/informativos/cultivo_azeitona.htm>. Acesso em 10 mai. 2007.

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 2006. Disponível em: <www.epamig.br/clipping/clip-160506.pdf>. Acesso em 16 abr. 2007.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis Camb*), Campinas, **Revista Química Nova**, v.21, n.1, p. 16 – 19, 1998.

FERNÁNDEZ SAN JUAN, P. M. Sterol composition of vegetable oils by GLC. In: **Proceeding Thirteenth International Symposium Capillary Chromatography.** Riva del Garda: Huethig, v. 1, 1991.

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.

FRAGAKI, G.; SPYROS, A.; SIRAGAKIS, G.; SALIVARAS, E.; DAIS, P. Detection of extra virgin olive oil adulteration with lampante olive oil and refined olive oil using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** Easton, v. 53, n. 8, p. 2810 - 2816, 2005.

GOODACRE, R.; KEL, D. B.; BIANCHI, G. Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** London, v. 63, p. 297 – 307, 1993.

GRACIAN, J. The chemistry and analysis of olive oil. In: Boekenoogen, H. A. Analysis and characterisation of oils, fats and fat products. London, Interscience Publ., v. 2, p. 317 – 591, 1968.

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

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**. London, v. 22, n. 8, p. 475 – 476, 1973.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR (IDEC). Teste revela fraude no azeite de oliva. **Consumidor S. A.**, n. 4, p. 6 – 9, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Azeite de Oliva**. Disponível em <www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/azeite.asp> Acesso em 28 set 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. 7. ed. London, Blackwell Scientific Publications, 1987.

IOOC – Internacional 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: 18 abr. 2007.

ITOH, T.; YOSHIDA, K.; YATSU, T.; TAMURA, T.; MATSUMOTO, T. Triterpene alcohols and sterols of spanish olive oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 58, p. 545 – 550, 1981.

KAPOULAS, V. M.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Detection of olive oil adulteration with linoleic acid-rich oils by RP-HPLC. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 366, p. 311 – 320, 1986.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. Olive oil: a review. **Advances in Food Research**. New York, v. 31, p. 453 – 483, 1987.

KIRITSAKIS, A. K. El aceite de oliva. A. Madrid, Vicente, Ediciones, 1992.

LANZÓN, 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.

LI-CHAN, E. Developments in the detection of olive oil. **Trends in Food Science & Technology**. v. 5, n.1, p. 3 – 11, 1994.

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.

LOPES, R. L. T.; ARAÚJO, N. C. **Resposta Técnica – Azeite de Oliva: Produção de Azeite**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). 2005. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt476.pdf>>. Acesso em 16 abr. 2007.

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. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

OLIAS-JIMÉNEZ, J. M.; DOBARGANES-GARCIA, M. C.; GUTIÉRREZ ROSALES, F.; GUTIÉRREZ GONZALES-QUIJANO, R. Componentes volátiles en el aroma Del aceite de oliva virgen. Identificación y análisis sensorial de los eluyentes cromatográficos. **Grasas y Aceites**. Sevilla, v. 29, n. 3, p. 211 – 218, 1978.

OLIVEIRA, A. F. **Por que pesquisar a oliveira?** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Ano VII, nº 137, outubro de 2006. Disponível em: <<http://www.epamig.br>>. Acesso em 16 abr. 2007.

PALMER, A. J.; PALMER, F. J. Rapid analysis of triacylglycerols using HPLC with LSD. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 465, p. 369 – 377, 1989.

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, 1998.

PÉREZ-CAMINO, M. C. MARQUEZ-RUIZ, G., DOBARGANES, M. C. Alteración de grasas usadas em fritura. 1. Comportamento de aceites de oliva, girasol em freidoras domésticas. **Grasas y Aceites**. Sevilla, v. 38, n. 5, p. 307 – 317, 1987.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TIOVO, 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.

PROTESTE – Associação Brasileira de Defesa do Consumidor. **Azeite `batizado`**. Ano I, nº 8, p. 7 – 12, 2002. Disponível em <www.proteste.org.br/private/43/436261_Attach.pdf>. Acesso em 28 set 2005.

PRO TESTE – Associação Brasileira de Defesa do Consumidor. **Azeites: o tempero da sua salada**. Ano VI, nº 58, p. 24 – 29, 2007.

RANALLI, A.; MATTIA, G; FERRANTE, M. L. Comparative evaluation of the olive oil given by a new processing system. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 32, p. 289 – 297, 1997.

RANALLI, A.; SGARAMELLA, A., SURRICCHIO, G. The new “Cytolase 0” enzyme processing aid improves quality and yields of virgin olive oil. **Food Chemistry**. Oxford, v. 66, p. 443 – 454, 1999.

RANALLI, A.; MODESTI, G.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G. The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar – I77. **Food Chemistry**. Oxford, v. 69, p. 37 – 46, 2000a.

RANALLI, A.; COSTANTINI, N.; MATTIA, G; FERRANTE, M. L. Evaluating two kinds of centrifuged virgin oils arising from continuous olive processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v. 80, p. 673 – 683, 2000b.

RANALLI, A.; CABRAS, P.; IANNUCCI, E.; CONTENUTO, 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.

REZANKA, T.; MARES, P. Determination of plant triacylglycerols using CGC, HPLC and MS. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 542, p. 145 – 159, 1991.

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.

SABA, A.; MAZZINI, F.; RAFFAELLI, A.; MATTEI, A.; SALVADORI, P. Identification of 9(E), 11(E)-18:2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 53, n. 12, p. 4867 - 4872, 2005.

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

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

UCEDA, M.; HERMOSO, M. La calidad del aceite de oliva. **El Cultivo del Olivo**. 2ª. ed., p. 547 – 572, 1998.

UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) nº 2568/91. Relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. **Diário Oficial de la Unión Europea**. 06 noviembre 2003. 98 p.

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

ANEXO 1

- Amostra B: desde o início das análises, quando se determinou o índice de qualidade através da extinção específica, os resultados já apontavam que esta amostra estava adulterada. Posteriormente, o perfil de ácidos graxos levantou a suspeita de adulteração com óleo de soja devido ao alto teor do ácido linolênico, que foi confirmada através da determinação da diferença do ECN42 experimental e teórico.

Além disso, o teor de isômeros *trans* desta amostra foi muito alto para a soma de ácidos graxos *trans* linoléico e linolênico, evidenciando ainda mais a fraude deste azeite. Finalmente, a quantificação de estigmastadieno foi muito alta e composição esterólica fora dos padrões estabelecidos pela Legislação confirmando, mais uma vez, a fraude da amostra **B** com óleo vegetal refinado. O óleo de soja foi apontado como o agente adulterante desta amostra.

- Amostra E: esta amostra foi, certamente, a mais grosseiramente adulterada de todas aquelas analisadas. Já na extinção específica, este azeite apresentou os piores resultados para as leituras realizadas no comprimento de onda de 270 nm e diferença ΔK . Na análise de composição em ácidos graxos, a amostra **E** apresentou baixo teor dos ácidos oléico, palmítico e linolênico e alto teor de linoléico e behênico, que sugeriram adulteração com óleo de girassol normal.

Os teores de ácidos graxos *trans* linoléico e linolênico ficaram muito acima do permitido. Além disso, os teores de monoinsaturados, poliinsaturados e o índice de iodo evidenciaram que o agente adulterante desta amostra contém um perfil de ácidos graxos completamente diferente do azeite de oliva. A determinação da diferença do ECN42 experimental e teórico, por sua vez, teve como resultado um valor extremamente alto, sustentando as suspeitas já levantadas.

As análises posteriores foram a quantificação de estigmastadieno, que detectou a presença de óleo vegetal refinado, e a análise de esteróis, que confirmou que o agente adulterante da amostra **E** foi o óleo de girassol refinado, pela quantificação de 12,8% de Δ^7 -estigmastenol nesta amostra.

- Amostra G: esta amostra apresentou uma característica muito particular. Inicialmente, os critérios de qualidade já demonstraram que algum tipo de adulteração estava presente neste azeite. Começando pelas análises de ácidos graxos livres e índice de peróxido, que apresentou, para ambas análises, resultados extremamente baixos. Em seguida, no coeficiente de extinção específica, a amostra **G** obteve os mais altos valores para o comprimento de onda a 232 nm com e sem alumina.

O perfil em ácidos graxos não sugeriu a fraude com outros óleos vegetais. No entanto, os resultados dos ácidos graxos *trans* evidenciaram a adulteração, apresentando valores muito altos para os isômeros *trans* oléicos e para a soma dos isômeros *trans* linoléicos e linolênicos.

A análise de ECN42 mostrou um resultado bastante alto para esta amostra e a quantificação de estigmastadieno também apresentou valor extremamente alto, evidenciando que a amostra foi submetida a tratamentos térmicos muito intensos. Finalmente, através da quantificação de esteróis, foi possível afirmar com certeza que a amostra **G** foi adulterada com bagaço de oliva; esta conclusão foi possível a partir da avaliação do teor de esteróis totais em conjunto com as demais análises.

- Amostra L: a princípio, durante as análises de critérios de qualidade, não foi possível detectar com certeza a alteração desta amostra. Apesar desta apresentar valores acima do permitido por Legislação para o coeficiente de extinção específica nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm sem alumina,

seus valores não foram considerados relevantes, uma vez que, por ter apresentado alto valor de peróxido, estes valores poderiam ser resultado da alta oxidação deste azeite.

Da mesma forma, os resultados apresentados pela composição em ácidos graxos e isômeros *trans* foram considerados absolutamente dentro do estabelecido para estas análises.

Por outro lado, através dos resultados apresentados nas análises de ECN42 e de estigmastadieno, foi possível constatar que a amostra **L** era realmente adulterada com algum óleo vegetal refinado. E, para finalizar as análises, com a quantificação de esteróis foi finalmente possível confirmar que esta amostra foi fraudada com azeite de oliva refinado.

É importante ressaltar ainda que, pelo fato das análises de ECN42 e estigmastadieno praticamente não serem executadas pela maioria dos laboratórios de controle de qualidade, a amostra **L** não seria apontada como adulterada, uma vez que as outras análises não detectaram esta fraude. No entanto, uma exceção para este caso é o Instituto Adolfo Lutz, que realiza a determinação da diferença do ECN42 experimental e teórico como rotina.

- **Amostra P:** de maneira semelhante à amostra anterior, este azeite também não apresentou características de uma amostra adulterada durante a realização das análises de critérios de qualidade, composição em ácidos graxos e isômeros *trans*.

Entretanto, não há dúvidas de que a amostra **P** foi fraudada quando se analisa o resultado das análises de ECN42 e estigmastadieno. Ambas confirmaram que esta amostra era adulterada com óleo vegetal refinado. A quantificação de esteróis, por sua vez, apresentou um perfil que colocou em dúvida sobre o agente adulterante desta amostra.

Por isso, foi possível supor que a amostra **P** tenha sido adulterada com azeite de oliva refinado (por causa do resultado apresentado na análise de ECN42), óleo de soja (resultado de estigmastadieno) ou até mesmo a mistura dos dois óleos (resultado de esteróis).

- Amostra S: as análises de ácidos graxos livres e índice de peróxido, realizadas para esta amostra apresentaram ótimos resultados. Por outro lado, os valores da extinção específica foram aceitáveis, por apresentarem valores um pouco acima do permitido para o comprimento de onda de 270 nm sem alumina e ΔK . Para os critérios de pureza, todas as análises apresentaram resultados satisfatórios e, por este motivo, pode-se afirmar que a amostra **S** não é adulterada.
- Amostra V: quanto aos critérios de qualidade, esta amostra apresentou alto valor nas análises de ácidos graxos livres e diferença ΔK . Com relação ao perfil em ácidos graxos, a amostra **V** apresentou alguns valores acima do estabelecido por Legislação, mas este parâmetro isoladamente não foi capaz de afirmar se este azeite era realmente adulterado.

No entanto, os resultados apresentados pela soma dos isômeros *trans* oléicos e pela soma dos isômeros *trans* linoléico e linolênico mostraram evidências de que esta amostra era fraudada com algum óleo vegetal refinado, e que talvez fosse o próprio azeite de oliva refinado.

A análise de ECN42 não detectou a fraude desta amostra, mas este comportamento é bastante esperado quando se trata de uma adulteração com azeite de oliva refinado. Por outro lado, a análise de estigmastadienos confirmou a adição de óleo vegetal refinado e a quantificação de esteróis mostrou que a amostra **V** realmente foi adulterada com azeite de oliva refinado.

- **Amostra X**: esta amostra apresentou bons resultados para os critérios de qualidade, apesar de terem mostrado valores muito próximos aos limites máximos permitidos para as análises de ácidos graxos livres, índice de peróxido e extinção específica. Deve-se considerar, ainda, que a extinção específica no comprimento de onda de 270 nm sem alumina ultrapassou o limite máximo estabelecido pela Legislação, sendo o único parâmetro capaz de levantar alguma suspeita de adulteração da amostra **X**.

A composição em ácidos graxos, o teor de isômeros *trans*, a determinação da diferença do ECN42 experimental e teórico e a quantificação de estigmastadieno apresentaram valores dentro do limite permitido.

Mesmo assim, devido aos resultados obtidos estarem muito próximos ao limite estabelecido para várias análises, realizou-se a metodologia de identificação dos esteróis, um parâmetro a mais para identificar ou descartar a hipótese de uma possível fraude nesta amostra.

O resultado apresentado pela quantificação esterólica certificou que a amostra **X** não era adulterada e, além disso, comprovou que os limites estabelecidos pela Legislação são bem definidos e confiáveis, especialmente para a análise de estigmastadienos.

- **Amostra Bb**: os resultados dos critérios de qualidade para esta amostra foram muito ruins. A análise de ácidos graxos livres apresentou um valor bastante alto e a extinção específica, por sua vez, mostrou valores muito acima do estabelecido por Legislação para todos os comprimentos de onda avaliados.

As análises de composição em ácidos graxos e isômeros *trans* não foram capazes de identificar a adulteração da amostra **Bb**. Por outro lado, a análise de ECN42 e a quantificação de estigmastadienos permitiram a detecção de

fraude nesta amostra, embora os valores apresentados estivessem próximos aos limites estabelecidos.

O perfil de esteróis, assim como ocorreu na amostra **P**, também gerou dúvida em relação ao agente adulterante utilizado. Os resultados anteriores sugeriam a presença de óleo de soja, pois o teor de ácido linolênico estava muito próximo do limite máximo permitido e, principalmente, pelos resultados muito ruins da extinção específica. Esta última análise não foi capaz de afirmar se o agente adulterante era uma mistura de óleos vegetais ou não, apenas conseguiu detectar com certeza a presença de óleo vegetal refinado, descartando a possibilidade de fraude exclusiva com azeite de oliva refinado.

- **Amostra Cc**: a detecção da adulteração deste azeite foi possível, unicamente, pela quantificação de estigmastadieno, uma vez que o resultado obtido estava acima do limite permitido por Legislação.

As análises de qualidade (ácidos graxos livres, índice de peróxido e extinção específica), mais uma vez, não foram capazes de identificar irregularidades nesta amostra, apesar da extinção específica a 270 nm estar acima do permitido.

As análises de composição em ácidos graxos, isômeros *trans* e a determinação da diferença do ECN42 experimental e teórico, também não conseguiram detectar nenhum tipo de fraude na amostra **Cc**. O óleo adicionado a esta amostra só pode ser confirmado através do perfil em esteróis, que apontou como agente adulterante o próprio azeite de oliva refinado.