

A maturação como fator determinante na atividade antioxidante e composição fenólica em frutos da Cv. Cobrançosa

A. Sousa^{1,2}, R. Malheiro^{1,2}, S. Casal², A. Bento¹, e J.A. Pereira¹

¹ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança. e-mail: jpereira@ipb.pt

² REQUIMTE/Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto.

Resumo

O grau de maturação é um dos principais fatores que influi na composição e bioatividade de azeitonas de mesa, bem como na obtenção de azeites de qualidade. Neste sentido, no presente trabalho foram estudadas as alterações sofridas por frutos da Cv. Cobrançosa ao nível da sua actividade antioxidante e composição fenólica ao longo da maturação do fruto, entre finais de setembro e novembro. A atividade antioxidante foi avaliada pelo efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e pelo método do poder redutor e o perfil fenólico foi avaliado por cromatografia líquida de alta resolução com um detector de díodos (HPLC/DAD).

Foram identificados e quantificados sete compostos fenólicos que variaram ao longo da maturação do fruto. A oleuropeína foi o composto mais abundante nas fases iniciais, reduzindo o seu teor drasticamente ao longo da maturação até ao seu desaparecimento completo. O hidroxitirosol foi o composto maioritário nas fases de maturação intermédias e avançadas. O teor total em compostos fenólicos variou entre 33856 mg/kg e 960 mg/kg, respectivamente, da primeira para à última data de amostragem. O potencial poder redutor dos frutos da Cv. Cobrançosa foi reduzindo ao longo da maturação, facto que se revelou estar relacionado com a composição fenólica.

A aplicação de técnicas quimiométricas ajudou a entender o efeito da maturação ao nível da actividade antioxidante e perfil fenólico. Os dados obtidos poderão também auxiliar na determinação de um momento óptimo de colheita para a Cv. Cobrançosa, de modo a melhorar as propriedades e composição tanto de azeite como de azeitonas de mesa.

Palavras chave: maturação; cultivar, Cv. Cobrançosa; atividade antioxidante; composição fenólica.

The maturation process as a determinant factor of the antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrançosa olive fruits

Abstract

Olive's maturation degree is one of the main factors influencing the composition and bioactivity of table olives, as well as the production of high quality olive oils. In this sense, olive fruits from Cv. Cobrançosa were studied for their antioxidant activity and phenolic composition during maturation, between September and November. Antioxidant activity was assessed by the scavenging effect on DPPH free radicals and reducing power methods and the phenolic profile was assessed by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/DAD).

During olives maturation seven phenolic compounds were identified and quantified. Oleuropein was the most abundant compounds in the earlier phases of maturation, followed by an intense decrease up to its complete disappearance. Hydroxytyrosol was the most abundant compound in middle and advanced maturation phases. Total phenols content varied from 33856 mg/kg and 960 mg/kg from first to the last sampling date. The reducing power of Cv. Cobrançosa olive fruits decreased during the maturation process, a fact revealed to be related with the phenolic composition.

The application of chemometric tools helped to understand the effect of maturation process on antioxidant activity and phenolic profile. The data obtained could also aid in the determination of a proximate optimum harvest date for Cv. Cobrançosa, so that table olives and olive oil composition and properties could be enhanced.

Keywords: maturation, Cv. Cobrançosa, antioxidant activity, phenolic composition

Introdução

Os produtos do olival, nomeadamente as azeitonas de mesa e o azeite, estão relacionados com diversos aspectos positivos para a saúde dos consumidores. Estas características estão directamente ligadas à composição da azeitona e à sua riqueza em compostos antioxidantes (Bendini et al., 2007). Existem diversos factores que influenciam a composição das azeitonas: a cultivar, a origem geográfica, as práticas culturais, o clima, e o processo de maturação. Durante o processo de maturação os frutos sofrem uma série de processos metabólicos que alteram e influenciam a quantidade em compostos bioativos, como os fenóis, tocoferóis, clorofilas e carotenóides, bem como ácidos gordos e esteróis (Matos et al., 2007). No que respeita aos compostos fenólicos, alguns estudos efetuados apontam para uma redução drástica destes compostos ao longo do processo de maturação (Rotondi et al., 2004). Desta forma é essencial estudar as variações ocorridas ao nível da azeitona relativamente à composição em compostos fenólicos e sua bioatividade. Este conhecimento permitirá estimar com maior exatidão o momento ótimo de colheita, de modo a valorizar os produtos, sua composição e bioatividade. Neste sentido, no presente estudo pretendeu-se caracterizar a composição fenólica de frutos da Cv. Cobrançosa bem como avaliar a sua atividade antioxidante, estudando as alterações ao longo do processo de maturação.

Material e Métodos

Amostragem: Foram marcadas cinco árvores da Cv. Cobrançosa onde se acompanhou a maturação dos frutos. Foram seleccionadas cinco datas de colheita (29 Setembro; 13 e 27 de Outubro; 10 e 18 de Novembro) sendo recolhidos aproximadamente 1 kg de frutos de cada árvore. As amostras foram limpas, avaliadas para o seu teor em humidade, congeladas e liofilizadas para posteriores análises.

Composição em compostos fenólicos:

Obtenção dos extractos fenólicos: Em cada data de colheita e por cada árvore, foram constituídas três subamostras. Os extratos foram preparados a partir de 1,5 g de azeitona liofilizada e 50 mL de metanol, durante 1h a 150 rpm. O extracto foi filtrado com papel de filtro e o resíduo re-extraído com duas porções adicionais de metanol. Os extratos combinados foram evaporados até à secura em evaporador rotativo e redissolvido em metanol.

Condições cromatográficas: Para a determinação do perfil fenólico foi usada uma coluna em fase reversa Spherisorb ODS2 (250 mm × 4 mm I.D., diâmetro de partícula 5 µm). As condições cromatográficas utilizadas foram as descritas por Malheiro et al. (2011) e por Vinha et al. (2005). Os cromatogramas foram quantificados a 280 nm e a informação espectral de todos os picos acumulada na gama dos 200-600 nm. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados com recurso a compostos padrão.

Avaliação da atividade antioxidante:

As amostras foram extraídas de acordo com o descrito por Malheiro et al. (2011). A atividade antioxidante foi avaliada por dois métodos: capacidade antiradicalar pelo método do DPPH e capacidade redutora pelo método do poder redutor, numa gama de concentrações que variaram entre 0,01 e 3 mg.mL⁻¹. O método do DPPH foi avaliado de acordo com a metodologia de Hatano et al. (1988) e o poder redutor foi avaliado pelo método descrito por Berker et al. (2007).

A capacidade sequestrante dos radicais livres de DPPH foi calculada pela percentagem de efeito sequestrante, equivalente a $[(A_{DPPH}-AS)/A_{DPPH}] \times 100$, onde A_{DPPH} é a absorvência da solução de

DPPH e A_S é a absorvência da solução de DPPH com extrato. A concentração de extrato capaz de sequestrar 50% dos radicais livres (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica do efeito sequestrante em função da concentração testada. No poder redutor a concentração necessária para atingir uma absorvência de 0,5 (EC_{50}) foi calculada por interpolação do gráfico da absorvência em função da concentração testada.

Análise estatística: Os dados obtidos na composição fenólica e atividade antioxidante foram aplicados numa análise de componentes principais (ACP) e numa análise discriminante linear (ADL). No primeiro caso, a ACP foi aplicada de modo a reduzir o número de variáveis (10 no total) a um número menor de novas variáveis derivadas (componentes principais, fatores ou dimensões) que sumariam adequadamente a informação original. A ADL foi aplicada de modo a classificar as diferentes datas de amostragem de acordo com o perfil fenólico e actividade antioxidante dos frutos da Cv. Cobrançosa.

A análise de variâncias foi avaliada com um intervalo de confiança de 5% através do teste de Tukey. Toda a avaliação estatística foi efectuada através do SPSS, versão 21.0.

Resultados e Discussão

Composição fenólica

A composição em compostos fenólicos ao longo da maturação da Cv. Cobrançosa frutos foi avaliada por HPLC/DAD. Foram identificados e quantificados sete compostos fenólicos, nomeadamente: hidroxitirosol, ácido clorogénico, verbascosídeo, oleuropeína, rutina, apigenina 7-*O*-glucósido e luteolina. As variações sofridas pelos frutos da Cv. Cobrançosa ao longo da maturação são apresentadas na Tabela 1, ordenadas pelos compostos maioritários na primeira colheita.

Tabela 1. Composição fenólica ($mg.kg^{-1}$ peso fresco) de frutos da Cv. Cobrançosa ao longo do processo de maturação.

<i>mg/kg (peso fresco)</i>	29 Set.	13 Out.	27 Out.	10 Nov.	18 Nov.
Oleuropeína	32938±204 d	3706±167 c	254±24 b	126±59 a	n.d.
Ácido clorogénico	788±12 c	n.d.	31±2 b	29±2 b	22±4 a
Apigenina 7-<i>O</i>-glucósido	131±2 b	96±8 a	88±10 a	97±5 a	131±20 b
Hidroxitirosol	n.d.	672± 83 b,c	663±4 b	614±6 c	439±13 a
Rutina	n.d.	89±8 a	160±16 c	127±20 b	250±4 d
Verbascosídeo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	66±3
Luteolina	n.d.	n.d.	n.d.	48±2 a	53± 4 b

Na mesma linha, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$). n.d. = não detetado.

A oleuropeína foi o composto fenólico maioritário no início da maturação (cerca de $3 g.kg^{-1}$). O seu teor decresce abruptamente ao longo da maturação do fruto, estando mesmo ausente na última data de colheita, indicando um estado de maturação avançado. Em azeitonas no início do processo de maturação, são esperados elevados teores de oleuropeína, uma vez que este composto se acumula na azeitona durante a fase de crescimento do fruto (Charoenprasert e Mitchell, 2012). Ao longo da maturação, este secoiridóide vai dando origem a diversos derivados, essencialmente por vias enzimáticas, o que provoca uma queda acentuada do seu teor. Em sentido inverso, o hidroxitirosol, um álcool fenólico ausente no início da maturação, é o fenol mais abundante em azeitonas com uma maturação intermédia e mais avançada. A sua tendência evolutiva ao longo da maturação tem vindo a ser discutida por diversos autores, parecendo apresentar comportamentos distintos de acordo com a cultivar. Alguns autores verificaram um aumento do hidroxitirosol durante a maturação (Bouaziz et al., 2004; Ryan et al., 1999) justificando que a sua formação advém da degradação da oleuropeína. No entanto, outros autores observaram uma redução ao longo da maturação (Damak et al., 2008; Morelló et al., 2004) justificando-a como possível consequência da ocorrência de hidrólise e processos oxidativos que ocorrem durante a maturação. Na Cv. Cobrançosa avaliada neste estudo, o teor de

hidroxitirosol aumenta significativamente na segunda amostragem, mantendo-se constante em azeitonas com maturação intermédia, verificando-se uma diminuição em azeitonas com maturação mais avançada. Nos restantes compostos fenólicos é de ressaltar o aumento no teor da rutina, o aparecimento de verbascosídeo em azeitonas com maturação avançada e a acentuada redução de ácido clorogénico (Tabela 1).

O somatório dos compostos fenólicos identificados foi calculado de modo a obter aproximadamente a quantidade total de fenóis nas amostras de azeitona da Cv. Cobrançosa. A variação observada é apresentada na Figura 1.

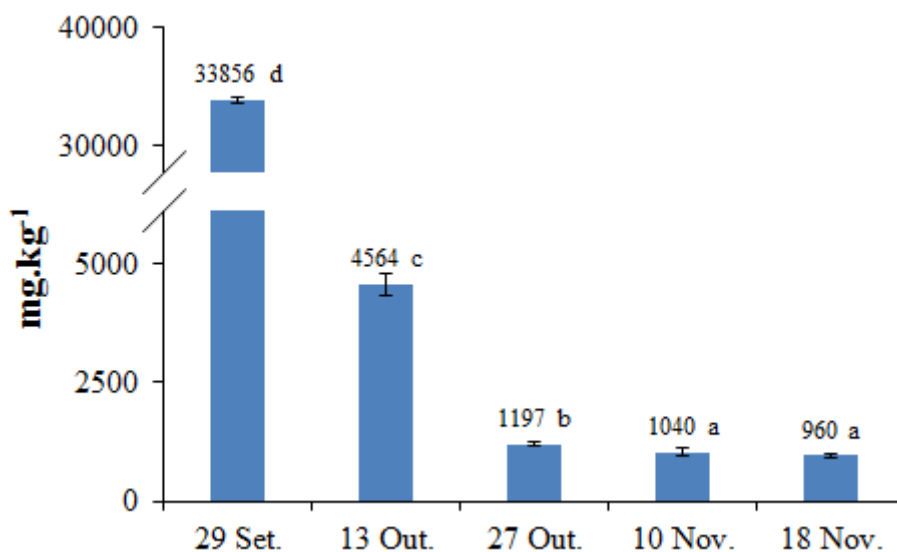


Figura 1. Variação ao longo da maturação do somatório dos compostos fenólicos (mg.kg⁻¹ peso fresco) de frutos da Cv. Cobrançosa (valores médios com letras diferentes, diferem significativamente, $P < 0,05$).

O teor em compostos fenólicos foi significativamente afectado pela maturação. Na última amostragem apenas aproximadamente 3% do teor em compostos fenólicos estava presente nos frutos, muito devido à redução no teor da oleuropeína.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de frutos da Cv. Cobrançosa ao longo do processo de maturação foi avaliada pela capacidade de sequestrar os radicais livres de DPPH e pelo poder de reduzir o complexo Fe³⁺/ferricianeto à sua forma ferrosa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antioxidante de frutos de Cv. Cobrançosa ao longo do processo de maturação.

mg.mL ⁻¹	29 Setembro	13 Outubro	27 Outubro	10 Novembro	18 Novembro
EC ₅₀ DPPH ^a	0,16±0,003 b	0,14±0,002 a	0,15±0,003 b	0,18±0,008 c	0,16±0,031 a-c
EC ₅₀ Poder redutor ^b	0,36±0,064 a	0,40±0,006 a,b	0,44±0,02 a	0,55±0,027 b	0,53±0,035 b

Dentro da mesma linha, valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$).

^aConcentração efectiva na qual 50% de radicais livres de DPPH são sequestrados; ^bConcentração efetiva na qual a absorvência de 0,5 é obtida.

Os valores de EC₅₀ para o método do DPPH variaram ligeiramente com o avanço da maturação, tendo-se observado uma atividade antioxidante inferior nas azeitonas colhidas a 10 de Novembro (0,18 mg.mL⁻¹). No entanto, em azeitonas com avançado estado de maturação, o valor de EC₅₀ não difere significativamente do registado em azeitonas verdes, no início do processo de maturação.

Quanto ao potencial redutor, é verificado que quanto maior o avanço da maturação menor é o potencial antioxidante dos frutos da cv. Cobrançosa. Valores mais elevados de EC_{50} , indicativos de uma menor atividade antioxidante, foram registados em azeitonas colhidas nas duas últimas amostragens. Este facto poderá estar relacionado com o teor em compostos fenólicos das amostras.

Quando se aplicaram técnicas quimiométricas aos dados obtidos verificou-se que é possível discriminar e classificar as amostras de acordo com a sua data de colheita (Figura 2).

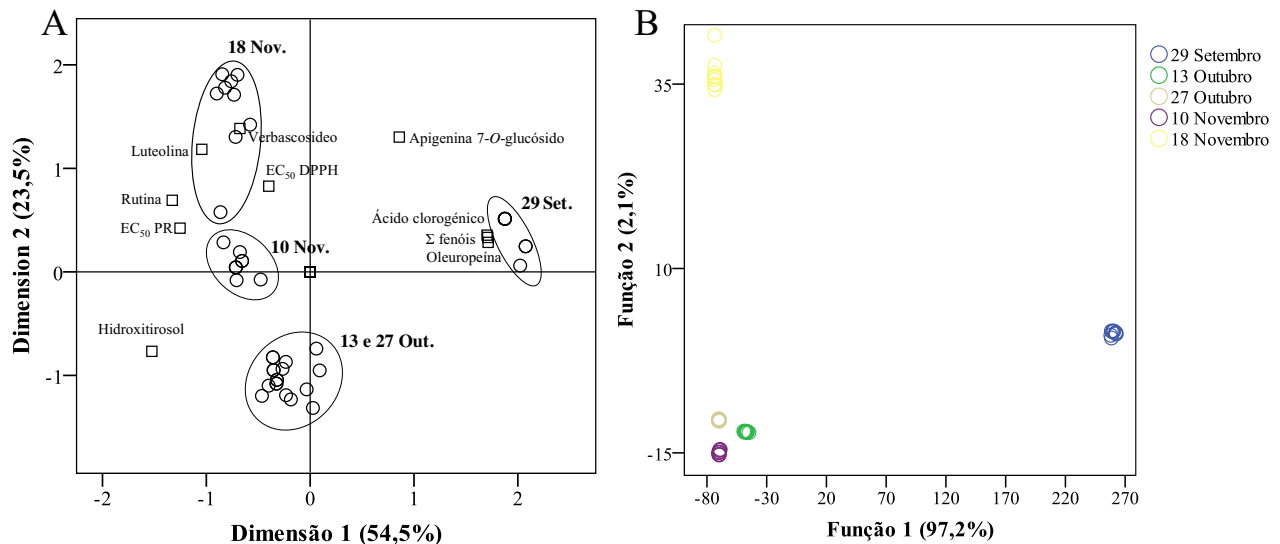


Figura 2. ACP (A) e ADL (B) obtidas a partir do perfil fenólico e atividade antioxidante de frutos da Cv. Cobrançosa ao longo do processo de maturação.

Na Figura 2A verifica-se que as amostras no início de maturação são caracterizadas por maiores teores de compostos fenólicos totais, oleuropeína e ácido clorogénico. No extremo oposto estão as amostras colhidas nas duas últimas amostragens, que são caracterizadas por valores elevados de EC_{50} e elevados teores em verbascosídeo, luteolina e rutina. As amostras com uma maturação intermédia foram caracterizadas por elevados teores de hidroxitirosol. Na Figura 2B verificam-se parte dos resultados obtidos na discriminação das amostras. O modelo foi baseado em 5 das 10 variáveis: oleuropeína, verbascosídeo, luteolina, ácido clorogénico e valor de EC_{50} do DPPH. Verifica-se uma maior distinção entre as amostras da primeira e ultima datas de colheita. O modelo mostrou ser bastante satisfatório na classificação das amostras, uma vez que 100% das amostras foram correctamente classificadas de acordo com a data de colheita, demonstrando a especificidade do perfil fenólico e da actividade antioxidante durante o processo de maturação.

Conclusões

Através da realização deste trabalho conclui-se que o processo de maturação influencia drasticamente a composição fenólica e a actividade antioxidante dos frutos da Cv. Cobrançosa. O teor em compostos fenólicos totais reduz drasticamente ao longo da maturação e com isso a bioactividade é afectada de igual modo, tendo-se verificado uma perda de potencial antioxidante pelo efeito redutor por parte dos frutos ao longo da maturação. Conclui-se que quanto mais tarde for programada a colheita dos frutos tanto para produção de azeitona de mesa como para a produção de azeite, mais pobre será a fracção fenólica da matéria-prima o que poderá condicionar a bioactividade dos produtos finais, com perdas de benefícios para o consumidor final.

Agradecimentos

Anabela Sousa agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), POPH-QREN e FSE pela bolsa de doutoramento concedida (SFRH/BD/44445/2008). Os autores agradecem ao PRODER (Programa de Desenvolvimento Rural) do Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território e à EU-LEADER pelo apoio financeiro através do projecto “OlivaTMAD – Rede Temática de Informação e Divulgação da Fileira Olivícola de Trás-os-Montes e Alto Douro”.

Bibliografia

- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez- Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Frnández-Gutiérrez, A., and Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* **12**, 1679-1719.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., and Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. *Talanta* **72**, 1157–1165.
- Bouaziz, M., Chamkha, M., and Sayadi, S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5476-5481.
- Charoenprasert, S., and Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 7081-7095.
- Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi M., Sayadi, S., and Damak, M. (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 1560–1566.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., and Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **36**, 2090-2097.
- Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., and Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 450–457.
- Matos, L. C., Cunha, S. C., Amaral, J. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M., and Oliveira, M. B. (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry* **102**, 406–414
- Morelló, J. -R., Romero, M. -P., and Motilva, M. -J. (2004). Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6002–6009.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G., and Toschi, G. T. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3649–3654.
- Ryan, D., Robards, K., and Lavee, S. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science & Technology* **34**, 265–274
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, M. S., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., and Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* **89**, 561–568.