

## Caracterização da fração volátil de azeitonas representativas da região de Trás-os-Montes: cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana

R. Malheiro<sup>1,2</sup>, S. Casal<sup>2</sup>, S. Cunha<sup>2</sup>, C. Petisca<sup>2</sup>, P. Baptista<sup>1</sup>, A. Bento<sup>1</sup>, e J.A. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

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

### Resumo

A fracção volátil das matérias-primas exerce um papel fundamental tanto na qualidade final dos produtos alimentares bem como no que diz respeito à sua aceitabilidade por parte do consumidor. Em Trás-os-Montes, uma região com forte tradição olivícola, a qualidade dos produtos do olival (azeite, azeitonas de mesa e pastas de azeitona) passa indiscutivelmente pela fracção volátil dos mesmos, sendo o factor varietal preponderante.

Neste sentido, pretendeu-se caracterizar a fracção volátil das três cultivares de azeitona mais representativas de Trás-os-Montes (Cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana) por HS-SPME e GC/MS. A azeitona foi colhida próximo do momento óptimo de colheita (índice de maturação = 3; 3<sup>a</sup> semana de Outubro 2011), com 5 lotes por cultivar.

As diferentes cultivares influenciaram tanto qualitativamente como quantitativamente a fracção volátil das azeitonas, tendo estas sido caracterizadas maioritariamente por hidrocarbonetos (tolueno), álcoois ((Z)-3-hexen-1-ol e 1-hexanol), aldeídos (hexanal, heptanal, benzaldeído, nonanal, decanal), ésteres ((Z)-3-hexen-1-ol acetato), cetonas (6-metil-5-hepten-2-ona), monoterpénos ( $\alpha$ -pineno, limoneno, L-mentol) e sesquiterpénos ((+)-ciclosativeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -muuroleno). Os hidrocarbonetos, álcoois e aldeídos foram as classes químicas presentes com maior abundância, sendo o tolueno, o (Z)-3-hexen-1-ol e o nonanal os voláteis mais abundantes. O (Z)-3-hexen-1-ol juntamente com o hexanal estão associados a sensações verdes e a erva, característica sensorialmente considerada como um atributo.

A fracção volátil é específica de acordo com a variedade de azeitona em estudo. Um aspecto a ter em conta a quando da elaboração de produtos à base de azeitona, tendo em vista também a aceitabilidade por parte do consumidor.

Palavras chave: cultivar; fracção volátil; HS-SPME; GC/MS

## Characterization of the volatile fraction of olive fruits from Trás-os-Montes region: cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana

### Abstract

The volatile fraction of raw materials plays a fundamental role in the quality of final food products as well as concerning consumers' acceptability. In Trás-os-Montes, a region with strong tradition in olive growing, the quality of olive products (olive oil, table olives and olive paste) is undoubtedly related with the volatile fraction of the fruits, being preponderant the varietal factor.

In this sense, it was intended to characterize the volatile fraction of three of the most representative olive cultivars from Trás-os-Montes (cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) by HS-SPME and GC/MS. The olives were collected close to the optimal harvest time (maturation index = 3; 3<sup>rd</sup> week of October 2011), with 5 samples per cultivar.

The different cultivars affected both qualitatively and quantitatively the volatile fraction being olives mainly characterized by hydrocarbons (toluene), alcohols ((Z)-3-hexen-1-ol and 1-hexanol), aldehydes (hexanal, heptanal, benzaldehyde, nonanal, and decanal) esters ((Z)-3-hexen-1-ol acetate), ketones (6-methyl-5-hepten-2-one), monoterpenes ( $\alpha$ -pinene, limonene, L-menthol) and sesquiterpenes ((+)-cyclosativene,  $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -muurolene). Hydrocarbons, alcohols and aldehydes were the most abundant chemical classes, being toluene, (Z)-

3-hexen-1-ol and nonanal the volatile compounds in higher amounts. (Z)-3-hexen-1-ol together with hexanal are associated to green sensations and cut grass, a sensory characteristic considered an attribute.

The volatile fraction is specific according to the olive variety in study. An aspect to be considered during the elaboration of products based on olives, also taking in account consumers' acceptability.

Keywords: olive cultivar; volatile fraction; HS-SPME; GC/MS

## Introdução

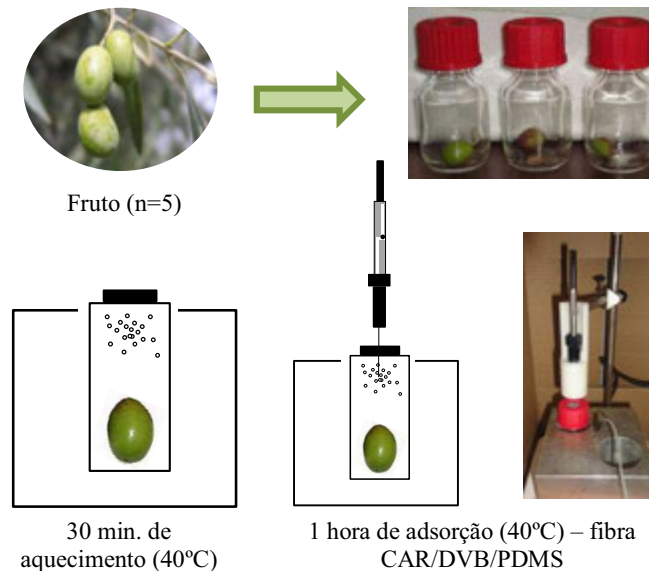
A fracção volátil é um factor preponderante na fidelização e aceitação de qualquer produto alimentar por parte do consumidor. No caso dos produtos do olival (azeitonas de mesa, azeite, pastas de azeitona), produtos que gozam de elevada popularidade e aceitabilidade por parte dos consumidores, a composição volátil intervém claramente ao nível da qualidade dos produtos. Grande parte dos voláteis, tanto de azeitonas de mesa como de azeites, provêm dos seus processos produtivos, nomeadamente do estilo utilizado na produção da azeitona de mesa e do processo de extração no azeite, no qual o processo de moenda é a etapa crucial (Servili et al., 2003). No entanto há outros factores que influenciam a composição volátil dos produtos do olival, como sejam a cultivar (Malheiro et al., 2011) e o grau de maturação das azeitonas (Baccouri et al., 2008). A maioria dos estudos realizados foca-se na fracção volátil de azeites, dando-se uma menor importância à fracção volátil de azeitonas de mesa e praticamente nenhuma importância à fracção volátil da matéria-prima - os frutos. Embora a fracção volátil dos produtos do olival dependa muito do seu método de elaboração, a matéria-prima que lhes dá origem poderá influir no seu perfil final, influência essa incrementada pela cultivar e pelo grau de maturação das azeitonas.

Neste sentido, no presente estudo pretendeu-se caracterizar a fracção volátil de azeitonas de cultivares representativas de Trás-os-Montes: cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana. Os frutos foram colhidos próximos do índice de maturação três, na terceira semana de Outubro de 2011) e a recolha dos compostos voláteis feita por microextração da fase sólida do espaço de cabeça (HS-SPME) sendo a análise feita por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS).

## Material e Métodos

**Amostragem:** O presente estudo incidiu em três das cultivares de azeitona mais representativas de Trás-os-Montes: cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana, plantadas no mesmo olival e sujeitas às mesmas condições culturais. De cada cultivar foram recolhidos frutos de cinco árvores no índice de maturação 3, à volta da árvore no interior e exterior da copa (3ª semana de Outubro de 2011). Os frutos foram levados para laboratório, limpos e refrigerados até análise.

**Microextracção em fase sólida:** As condições de microextracção em fase sólida do espaço de cabeça (HS-SPME) estão descritas na Figura 1.



**Figura 1. Condições de microextracção em fase sólida do espaço de cabeça (HS-SPME).**

**Avaliação do perfil volátil:** Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS). Foi usada uma coluna HP-5 (33 m x 250  $\mu\text{m}$  i.d., 0,25  $\mu\text{m}$ ) a operar a 80 kPa, com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> de hélio. O programa de temperaturas do forno foi o seguinte: 40 °C durante os primeiros 5 min, com incremento de 3 °C/min até aos 220 °C, sendo a temperatura assim mantida durante 2 min. Os espectros de massa foram obtidos por impacto electrónico a 70 eV, com um multiplicador de voltagem de 2056V. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massa com os existentes na biblioteca NIST 98 (NIST/EPA/NISH Mass Spectral Library, versão 1.6, E.U.A.). Para efeitos de quantificação as áreas cromatográficas foram obtidas por reconstrução do cromatograma em full-scan usando para cada composto o seu pico de base.

**Análise estatística:** Os dados obtidos na composição da fracção volátil das três variedades foram aplicados numa análise de componentes principais (ACP) de modo a reduzir o número de variáveis (17 no total) a um número menor de novas variáveis derivadas (componentes principais, factores ou dimensões) que sumariam adequadamente a informação original.

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

O perfil em compostos voláteis dos frutos das cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana foi influenciado pelo efeito da cultivar. Foram observadas diferenças qualitativas e diferenças significativas do ponto de vista quantitativo, como se pode verificar na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição volátil (%) de frutos das cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana (n = 5).

	Composto	Cobrançosa	Madural	Verdeal Transmontana
1	Éster metílico de ácido butanóico	2,34±0,55	n. d.	n. d.
2	Tolueno	46,56±5,32 a	43,39±7,32 a	74,25±3,84 b
3	Hexanal	4,33±0,58 b	1,67±0,31 a	1,85±0,59 a
4	(Z)-3-hexen-1-ol	4,55±1,55 a	7,58±2,68 b	3,88±1,46 a
5	1-Hexanol	n. d.	4,19±2,29	n. d.
6	Heptanal	2,25±0,21	n. d.	n. d.
7	$\alpha$ -Pinoeno	1,48±0,1	n. d.	n. d.
8	6-Metil-5-hepten-2-ona	n. d.	3,51±1,18 a	6,07±1,35 b
9	Octanal	5,14±0,70	n. d.	n. d.
10	(Z)-3-hexen-1-ol acetato	n. d.	16,05±9,22	n. d.
11	Limoneno	12,09±2,75 b	0,98±0,27 a	2,32±1,15 a
12	Nonanal	9,45±1,33 b	3,14±0,92 a	5,44±2,48 a
13	Mentol	1,90±0,38 a	n. d.	1,66±0,70 a
14	Decanal	4,47±0,79 b	2,41±0,93 a	n. d.
15	(+)-Ciclosativeno	n. d.	1,33±0,23	n. d.
16	$\alpha$ -Copaeno	2,44±0,73 a	14,61±6,32 b	4,54±0,47 a
17	$\alpha$ -Muuroleno	n. d.	1,14±0,20	n. d.

Valores médios na mesma linha com letras diferentes, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

O tolueno foi o composto volátil encontrado em maior abundância, variando entre os 43,39% na cv. Madural e os 74,25% na cv. Verdeal Transmontana. Este hidrocarboneto aromático é conotado com características sensoriais similares a tinta. Este hidrocarboneto está presente em azeites (Baccouri et al., 2008) sendo a sua origem ainda desconhecida. Alguns autores supõem que a sua presença poderá advir de contaminação exógena, bem como de mecanismos endógenos (Biedermann et al., 1995).

Seguindo-se ao tolueno estão os compostos conotados com sensações verdes, os GLV's (green leaf volatiles): (Z)-3-hexen-1-ol, o hexanal e o (Z)-3-hexen-1-ol acetato. O (Z)-3-hexen-1-ol encontra-se presente em maior abundância na cv. Madural (7,58%), estando o seu acetato apenas presente nesta mesma cultivar. Este facto poderá estar relacionado com o facto de a cv. Madural ter um processo de maturação mais rápido relativamente às outras duas cultivares. Deste modo, o (Z)-3-hexen-1-ol terá dado origem a elevados teores de (Z)-3-hexen-1-ol acetato devido a uma maturação mais avançada, através do mecanismo da lipoxigenase (LOX). Neste mecanismo o (Z)-3-hexen-1-ol é convertido em (Z)-3-hexen-1-ol acetato pela acção de álcool acetiltransferases. O hexanal, também formado pelo mecanismo da LOX, está presente em quantidades significativamente maiores na cv. Cobrançosa.

É de realçar também os elevados teores de limoneno, um composto de características cítricas, na cv. Cobrançosa e de  $\alpha$ -copaeno na cv. Madural. Este último composto está associado a sensações de madeira e picante. O nonanal, presente nas três cultivares, variou entre os 3,14% na cv. Madural e os 9,45% na cv. Cobrançosa.

No que respeita às diferentes fracções que compõem a fracção volátil dos frutos das cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana, verificaram-se sete classes químicas, como exposto na Figura 2.

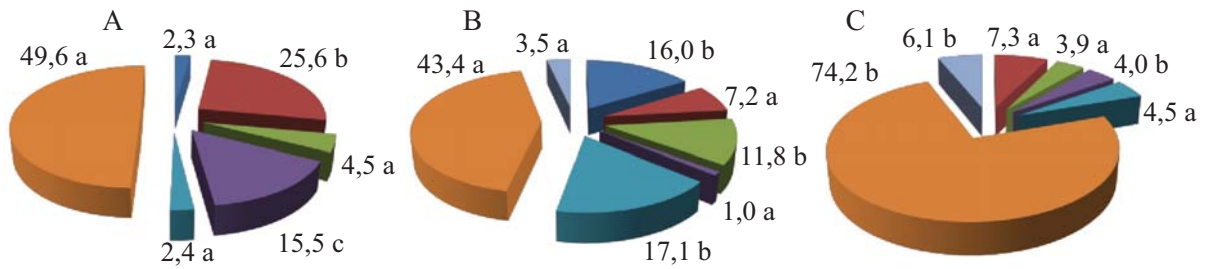


Figura 2. Abundância relativa (%) das diferentes classes químicas de compostos voláteis identificados nos frutos das cvs. Cobraçosa (A), Madural (B) e Verdeal Transmontana (C). Em cada classe química valores médios com letras diferentes, diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

Tal como nos compostos individuais, as classes químicas representadas variaram significativamente de acordo com a cultivar. A classe dos hidrocarbonetos foi a mais representativa, uma vez que o tolueno apresentou teores acima dos 40%. Seguiram-se os aldeídos na cv. Cobraçosa, os sesquiterpenos na cv. Madural e os álcoois na cv. Verdeal Transmontana. Na cv. Cobraçosa não foram encontradas cetonas, enquanto que na cv. Verdeal Transmontana não foram identificados ésteres.

De modo a verificar se seria possível distinguir as cultivares de acordo com o seu perfil volátil, foram aplicados os dados dos compostos voláteis identificados numa ACP. Como se pode verificar na Figura 3, as três variedades são completamente distintas no que respeita à sua fracção volátil. A primeira dimensão divide a cv. Verdeal Transmontana das restantes cultivares, enquanto a segunda dimensão permite a separação entre a cv. Madural e a cv. Cobraçosa.

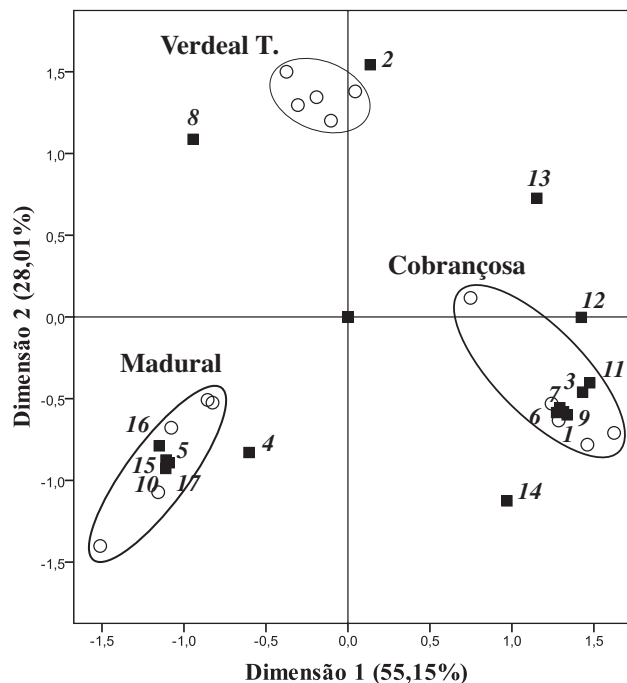


Figura 3. Análise de componentes principais da composição volátil dos frutos das cvs. Cobraçosa, Madural e Verdeal Transmontana (os números expostos dizem respeito aos compostos listados na Tabela 1). As dimensões explicam 83,16% da variância total.

A cv. Verdeal Transmontana foi essencialmente caracterizada pelos elevados teores de tolueno (2) e da cetona 6-metil-5-hepten-2-ona (8). A cv. Madural foi caracterizada pelos teores de 1-hexanol, (Z)-3-

hexen-1-ol acetato, (+)-ciclosativeno e  $\alpha$ -muuroleno (5, 10, 15 e 17 respectivamente; compostos apenas presentes nesta cultivar). A cv. Cobrançosa foi a única a reportar teores do éster metílico do ácido butanóico (1), heptanal (6),  $\alpha$ -pinene (7), e octanal (9).

## Conclusões

No presente trabalho concluiu-se que a fracção volátil da azeitona é dependente da cultivar. Diferenças qualitativas e quantitativas foram observadas tanto nos compostos voláteis individuais bem como nas diferentes classes químicas. A fracção volátil das cultivares de azeitona são essencialmente compostas por hidrocarbonetos, álcoois e aldeídos, com quantidades apreciáveis de compostos terpénicos e sesquiterpenos, dependendo da cultivar. A aplicação de uma ACP permitiu corroborar que a fracção volátil é característica da cultivar sendo possível a sua diferenciação e distinção.

## Agradecimentos

Ricardo Malheiro agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), POPH-QREN e FSE pela bolsa de doutoramento concedida (SFRH/BD/74675/2010). Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto EXCL/AGR-PRO/0591/2012 “Protecção da oliveira em modo de produção sustentável num cenário de alterações climáticas globais: ligação entre infraestruturais ecológicas e funções do ecossistema”

## Bibliografia

- Baccouri, O., Bendini, A., Cerretani, L., Guerfel, M., Baccouri, B., Lrcker, G., Zarrouk, M., and Ben Miled, D. (2008). Comparative study on volatile compounds from Tunisia and Sicilian monovarietal olive oils. *Food Chemistry* **111**, 322-328.
- Biedermann, M., Grob, K., and Morchio, G. (1995). On the origin of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in extra virgin olive oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **200**, 266-272.
- Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Casal, S., Bento, A., and Pereira, J. A. (2011). Determination of the volatile profile of stoned table olives from different varieties by using HS-SPME and GC/IT-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 1693-1701.
- Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposito, S., and Montedoro, G. (2003). Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7980-7988.