



Ana Sofia Salgueiro Costa da Costa Ribeiro

Licenciada em Engenharia Agrícola

**Contributo para a caracterização de azeite virgem
extra de qualidade superior na região Alentejo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Engenheira Maria Dolores Humanez Martín,
Directora Técnica COTECNISUR, S.L., Cordoba

Coorientador: Carolina Pereira Rodrigues, Investigadora,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte – FCT/UNL

Arguente: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves – FCT/UNL

Vogal: Doutora Ana Luisa Almaça da Cruz Fernando – FCT/UNL

“Contributo para a caracterização de azeite virgem extra de qualidade superior na região Alentejo” © Ana Sofia Salgueiro Costa da Costa Ribeiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Desde o momento em que se começou a delinear esta Tese muitas foram as pessoas que se disponibilizaram para torná-la realidade e a quem desejo expressar a minha gratidão pelo apoio e cooperação que prestaram. A quem primeiro manifesto o meu agradecimento são às orientadoras desta dissertação que foram incansáveis:

Professora Doutora Ana Luísa Fernando, por aceitar este meu convite, por todo o apoio científico e inteira disponibilidade para a realização deste trabalho, pela sua paciência e boa disposição sempre presentes.

Engenheira Maria Dolores Humanes, por me incentivar para este tema, pelos seus ensinamentos no mundo do azeite e do olival, pelo seu apoio incondicional ao longo deste percurso sempre acompanhado do seu entusiasmo.

À Carolina Rodrigues pela preciosa ajuda e companheirismo em todo o trabalho de laboratório, tratamento dos resultados e revisão do texto. Com a tua ajuda foi mais fácil!

À Doutora Lourdes Humanes pela orientação técnica, apoio na pesquisa bibliográfica e por todo o ânimo que me deu ao longo desta etapa.

À empresa Olidal, na pessoa do Engenheiro José Castro Duarte, pela cedência das instalações do laboratório e por tudo o que foi necessário para conseguir extrair o azeite em condições adequadas. Aos colaboradores desta empresa Senhor Cavaco, Esmeralda, Rute, Dona Antónia, pelo seu acolhimento e espírito de equipa.

Aos agricultores pela sua amabilidade em disponibilizar as amostras de azeitona, fundamentais para a realização deste estudo.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por permitir utilizar as suas instalações e colocar à disposição material e equipamentos necessários há recolha de amostras e análises químicas. À Dona Rita Braga e Dona Rosa Pinto pela ajuda no laboratório.

A todos os professores do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, pela transmissão dos conhecimentos adquiridos.

A todos os colegas que se cruzaram nestes dois anos FCT e que fizeram toda a diferença!

À minha família por todo o apoio, compreensão e carinho.

Bem hajam!

Partes do presente trabalho foram já apresentadas publicamente:

Costa, S.; Rodrigues, C.; Souza, V.; Fernando, A. Caracterização físico-química de azeites monovarietais provenientes da região do Alentejo. Em: Vale, A.; Barbosa, C.; Velho, M.; Alves, M.; Araújo, M.; Barros, M.; Paes, P.; Pinheiro, R.; Rocha, S. (Editores). Livro de resumos do XIV Encontro de Química dos Alimentos, ISBN 978-989-98936-9-6, 2018, p.118.

RESUMO

O azeite é um dos principais componentes da dieta mediterrânica. A caracterização de azeites monovarietais permite identificar a singularidade das características de cada cultivar que lhe conferem propriedades únicas e valorizáveis, permitindo acrescentar valor ao azeite. Como tal, pretendeu-se com este estudo contribuir para o conhecimento da composição química de azeites monovarietais provenientes da região do Alentejo.

Foram selecionadas sete variedades de azeitona Arbequina, Blanqueta, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Picual e Verdeal de Serpa, por serem atualmente as que melhor representam a área plantada de olival na região Alentejo, principal região olivícola de Portugal. As amostras de azeitona foram recolhidas diretamente das explorações agrícolas, na época normal de colheita da campanha de 2017/2018, entre novembro e dezembro. A extração do azeite foi efetuada após a colheita através do método Abencor.

As análises realizadas confirmaram a classificação das amostras como azeite virgem extra, obtendo-se valores de ácidos gordos livres $\leq 0,8\%$, valores de índice de peróxidos $\leq 20 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ e índices espectralométricos na região do ultravioleta $\leq 0,22$ (K_{270}) e $2,50$ (K_{232}). Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, estes oscilaram entre $27 \pm 3 \text{ mg EAG/kg}$ (Arbequina) e 262 mg EAG/kg (Verdeal). A actividade antioxidante variou entre $0,43 \pm 0,05 \text{ mg EAA/kg}$ (Galega) e $0,87 \text{ mg EAA/kg}$ (Blanqueta). Os flavonóides entre $30 \pm 4 \text{ mg catequina/kg}$ (Cordovil) e $62 \pm 17 \text{ mg catequina/kg}$ (Verdeal de Serpa). O K_{225} relacionado com o atributo amargo variou entre $0,02$ (Arbequina) e $0,45 \pm 0,05$ (Verdeal de Serpa). A cor dos diferentes azeites localiza-se na zona dos verdes com um ângulo de Hue próximo de 178° , sendo o azeite da cv. Picual o mais verde e o azeite da cv. Galega vulgar o menos verde, o mais claro o da cv. Arbequina e o mais escuro o da cv. Blanqueta.

Todos os azeites alcançaram os níveis padrão para as alegações de saúde estabelecidos pela União Europeia que prevê 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados em 20 g de azeite que corresponde no mínimo a 250 mg de oleocantal e oleaceína por kg de azeite. O valor mais elevado foi observado nas cvs. Blanqueta, Cobrançosa e Cordovil (1000 mg/kg) e o valor mais reduzido na cv. Galega vulgar (250 mg/kg).

TERMOS CHAVE: Azeite virgem extra, cultivares, fenóis, flavonoides, oleocantal e oleaceína

ABSTRACT

Olive oil is one of the main components of the Mediterranean diet. The characterization of monovarietal olive oils allows to identify the uniqueness of the characteristics of each cultivar that give it unique properties, allowing to add value. As such, it was intended with this study to contribute to the knowledge of the chemical composition of monovarietal oils from the Alentejo region.

Seven varieties of olives Arbequina, Blanqueta, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Picual and Verdeal de Serpa were selected because they currently represent the planted area of olive groves in the Alentejo region, the main olive growing region of Portugal. Olive samples were collected directly from farms during the normal harvest season of the 2017/2018, season between November and December. The extraction of olive oil was carried out after harvesting using the Abencor method.

The analyzes confirmed the classification of the samples as extra virgin olive oil: free fatty acids values $\leq 0.8\%$, peroxide index values $\leq 20 \text{ meqO}_2/\text{Kg}$ and spectrophotometric indexes in the ultraviolet region $\leq 0,22 (K_{270})$ and $2,50 (K_{232})$. Regarding the total phenolic compounds content, they ranged from $27 \pm 3 \text{ mg EAG/kg}$ (Arbequina) to 262 mg EAG/kg (Verdeal de Serpa). The antioxidant activity ranged from $0,43 \pm 0,05 \text{ mg EAA/kg}$ (Galega vulgar) to 0.87 mg EAA / kg (Blanqueta). Flavonoids content observed was between $30 \pm 4 \text{ mg catechin/kg}$ (Cordovil) and $62 \pm 17 \text{ mg catechin/kg}$ (Verdeal de Serpa). The K_{225} related to the bitter attribute varied between $0,02$ (Arbequina) and $0,45 \pm 0,05$ (Verdeal de Serpa). The colour of the different oils is green with a Hue angle of 178° , being the oil of the cv. Picual the greener and the oil of the cv. Galega vulgar the less green. The clearer oil was obtained from cv. Arbequina and darkest was obtained from cv. Blanqueta.

All olive oils have reached the standard levels for health claims laid down by the European Union which provides for 5 mg of hydroxytyrosol and its derivatives in 20 g of olive oil corresponding to at least 250 mg of oleocantal and oleacein per kg of olive oil, the highest value of 1000 mg / kg (cvs. Blanqueta, Cobrançosa and Cordovil) and the lowest value of 250 mg/kg in cv. Galega vulgar.

KEYWORDS: Extra virgin oil, cultivars, phenolics, flavonoids, oleocantal and oleaceín

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - CARATERIZAÇÃO DO SETOR DO AZEITE	1
1.1.1 – a nível mundial e europeu	1
1.1.2 – a nível nacional	5
1.2 – A AZEITONA.....	13
1.2.1 – A composição da azeitona e sua formação	13
1.2.2 – Variedades de azeitona.....	15
1.3 OBTENÇÃO DE AZEITE VIRGEM	19
1.4 – O AZEITE.....	24
1.4.1 – Classificação do azeite.....	24
1.4.2 – Composição química do azeite	25
1.4.2.1 – a fração saponificável	26
1.4.2.2 - a fração insaponificável	29
1.4.3 – O AZEITE COMO PRODUTO NUTRACÊUTICO	36
1.5 – OBJETIVOS	44
2 – MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 -MATÉRIA PRIMA	45
2.2 – MÉTODOS UTILIZADOS	47
2.2.1 – DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO	47
2.2.2 – DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO, HUM., GORD.TOTAL E GORD.M.SECA.....	48
2.2.3 – DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS LIVRES	49
2.2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	50
2.2.5 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES ESPECTOFOTOMÉTRICOS (k_{232} , k_{270})	51

2.2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR EM COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	52
2.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
2.2.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO K_{225}	54
2.2.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES.....	55
2.2.10 DETERMINAÇÃO DA COR.....	56
2.2.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE OLEOCANTAL E OLEACEÍNA	57
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1 ÍNDICE DE MATURAÇÃO.....	59
3.2 RENDIMENTO, HUMIDADE, GORDURA TOTAL E GORDURA NA MATÉRIA SECA.....	63
3.3 ÁCIDOS GORDOS LIVRES	70
3.4 ÍNDICE DE PERÓXIDOS	72
3.5 ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO (K_{232} E K_{270}).....	75
3.6 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	79
3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	82
3.8 ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO K_{225}	83
3.9 FLAVONÓIDES TOTAIS.....	87
3.10 COR	88
3.10.1 Pigmentos (carotenoides e clorofila).....	88
3.10.2 Escala CIELAB	91
3.11 OLEOCANTAL E OLEACEÍNA	93
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	97
5 BIBLIOGRAFIA E REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS	
ANEXO II - CARACTERÍSTICAS DO AZEITE	118
ANEXO II - ESQUEMA DA TOMADA DE DECISÃO	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição mundial do olival.....	1
Figura 1.2 - Produção e consumo mundial de azeite	3
Figura 1.3 – Consumo de azeite <i>per capita</i> em 2014 (kg)	4
Figura 1.4 - Denominações de Origem Protegida do azeite em Portugal	7
Figura 1.5 – Evolução do azeite em Portugal.....	9
Figura 1.6 - Azeite extraído por região (campanha 2017/18)	10
Figura 1.7 – Principais destinos das exportações de azeite em Portugal (2015/16)	12
Figura 1.8- Esquema da secção da azeitona (a) e do caroço (b)	13
Figura 1.9- Sistemas de extração do azeite	20
Figura 1.10– Esquema representativo da formação de um triglicérido	28
Figura 1.11 - Principais mecanismos de ação propostos para o azeite virgem extra	37
Figura 1.12 – Pirâmide alimentar refletindo a Dieta Tradicional Mediterrânica	38
Figura 1.13 - Principais compostos fenólicos do azeite	40
Figura 1.14 - A sensação de irritação do oleocantal	42
Figura 2.1 – Localização geográfica dos pontos de recolha de azeitona	45
Figura 2.2 - Equipamento Abencor (1 - moinho, 2 – batedeira, 3 – centrífuga).....	46
Figura 2.3- Equipamento Foss Olivia TM	49
Figura 2.4– Correlação linear entre ($A_{300s} - A_{0s}$) e K_{225}	54
Figura 2.5 – Embalagem do Aristoleo [®] Test Kit e respetivo material.....	58
Figura 2.6 - Escala de cores do Aristoleo [®] Test Kit.....	58
Figura 3.1 - Azeitonas de diferentes cultivares utilizadas no ensaio e datas de colheita	59
Figura 3.2 - Evolução da maturação no CPRCO na campanha de 2015/2016	60
Figura 3.3 - Valores médios e desvio padrão do índice de maturação	61
Figura 3. 4 - Valores médios e desvio padrão da GT, HUM, GMS	64
Figura 3.5 - Valores médios e desvio padrão do rendimento industrial	67
Figura 3.6 - Aspeto das diferentes pastas de azeitonas após a fase de moenda	68
Figura 3.7 - Valores médios e desvio padrão do grau de extratabilidade	69
Figura 3.8 - Valores médios e desvio padrão dos ácidos gordos livres	70
Figura 3.9 - Valores médios e desvio padrão do índice de peróxidos	73
Figura 3.10 - Valores médios e desvio padrão da absorvência K_{232}	76
Figura 3.11 - Valores médios e desvio padrão da absorvência K_{270}	77
Figura 3.12 - Valores médios e desvio padrão do ΔK	78
Figura 3.13 - Valores médios e desvio padrão dos compostos fenólicos totais	80

Figura 3.14 - Valores médios e desvio padrão da atividade antioxidante	82
Figura 3.15 - Valores médios e desvio padrão do índice espectofotométrico K_{225}	85
Figura 3.16 - Relação entre o K_{225} e o índice de maturação	85
Figura 3.17 - Valores médios e desvio padrão do teor de flavonóides totais	88
Figur 3.18 - Valores médios e desvio padrão do teor de clorofilas	89
Figura 3.19 - Valores médios e desvio padrão do teor de carotenóides	90
Figura 3.20 - Valores médios e desvio padrão das coordenadas CIELAB	92
Figura 3.21 - Quantidade total combinada de oleocantal e oleaceína	93
Figura 3.22 - Combinação de oleocantal e oleaceína vs. chroma	95
Figura 3.23 - Comparação de oleocantal e oleaceína Aristoleo Test kit vs chroma	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Produção de azeite no mundo, na União Europeia	2
Tabela 1.2 – Evolução do consumo de azeite per capita entre 2005 e 2015.....	11
Tabela 2.1– Caracterização dos olivais onde foram recolhidas as amostras	45
Tabela 2.2 - Codificação das amostras de azeite e data da colheita da azeitona	46
Tabela 2.3 – Escala para obtenção do Índice de Maturação	47

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,4-DHPEA-EDA	oleaceína (forma dialdehídica do ácido elenólico ligado ao hidroxitirosol)
Abs	Absorvância
AGE	ácidos gordos essenciais
AGMI	ácidos gordos mono-insaturados
AGPI	ácidos gordos poli-insaturados
COI	Conselho Oleícola Internacional
cv	Cultivar
DPPH	2,2'-difenil.1.picril-hidrazilo
EAA	equivalente de ácido ascórbico
EAC	equivalente de ácido caféico
EAG	equivalente de ácido gálico
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
GMS	gordura na matéria seca
GT	Gordura total
H	Humidade
I & D	Investigação e desenvolvimento
IM	Índice de maturação
meq	Miliequivalente
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimol
MUFA	monounsaturated fatty acids
nm	Nanómetro
NP	Norma portuguesa
p-HPEA-EDA	oleocantal (forma dialdehídica do ácido elenólico ligado ao tirosol)
PUFA	polyunsaturated fatty acids
UV	Ultraviolet

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARATERIZAÇÃO DO SETOR DO AZEITE

1.1.1 A NÍVEL MUNDIAL E EUROPEU

O mercado mundial de azeite está limitado pela geografia da sua produção, circunscrita às duas faixas do globo situadas entre os paralelos 30º e 45º dos hemisférios norte e sul, atendendo aos requisitos edafo-climáticos da olivicultura como se representa na Figura 1.1 (Fernandes, s.d.).

A superfície de olival encontra-se distribuída pelos cinco continentes e pelos 47 países produtores de azeite ultrapassando os 11 milhões de hectares. Dado que a oliveira se encontra presente em ambos os hemisférios existem duas campanhas de colheita de azeitona para a extração de azeite, uma primeira desde os meses de outubro a abril no hemisfério norte e outra de abril a julho no hemisfério sul (COI,2015).

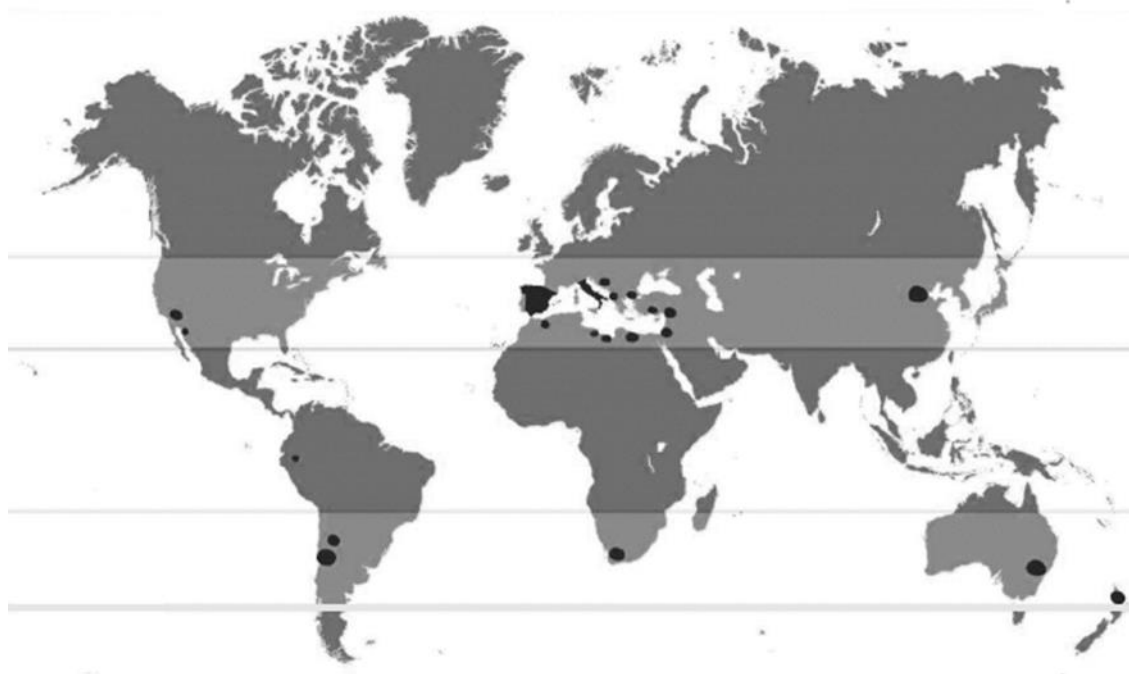


Figura 1.1 - Distribuição mundial do olival
(adaptado de Coosur, 2018)

Atualmente, 95% da superfície olivícola mundial está concentrada na bacia mediterrânica (COI,2015), região em que o azeite é obtido há mais de 6.000 anos (Fernandes, s.d), sendo os

países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia, Portugal, Chipre, Croácia, Eslovénia e Malta) responsáveis por 75% da produção mundial (GPP,2017). Os restantes principais países produtores são Tunísia (4%), Turquia (7%), Síria (4%), Marrocos (4%) e Argélia (3%) (Casa do Azeite, 2018).

No mercado mundial das gorduras, vegetais e animais, que representam 184 milhões de toneladas, a produção de azeite corresponde a 1,7% ou seja 3,1 milhões de toneladas (COI,2015). No entanto nas gorduras vegetais, o óleo de palma continua a ser o mais utilizado mundialmente com 42 milhões de toneladas, seguido pelo óleo de soja com um consumo mundial superior a 37 milhões de toneladas. O óleo de colza e o óleo de girassol apresentam uma quota significativa com 22 e 12 milhões de toneladas, respetivamente(FAO, 2018).

Tabela 1.1 – Produção de azeite no mundo, na União Europeia e nos principais países produtores entre as campanhas de 2010/11 e 2017/18 (1.000 ton)

Campanha	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18*	% Participação 2016/17
Mundo	3075,0	3406,5	2425,0	3270,0	2393,0	3176,0	2538,5	2894,0	100
União Europeia	2209,1	2395,2	1459,4	2476,0	1532,0	2324,0	1747,5	1805,0	69
Por países									
Espanha	1391,9	1613,4	616,3	1775,8	825,7	1403,3	1286,6	1090,5	51
Itália	440,0	450,0	415,5	461,0	303,0	474,6	182,3	320,0	7
Grécia	301,0	295,0	357,9	131,0	300,0	320,0	195,0	300,0	8
Tunísia	120,0	180,0	220,0	70,0	260,0	140,0	100,0	220,0	4
Turquia	160,0	191,0	195,0	190,0	190,0	150,0	177,0	287,0	7
Síria	180,0	198,0	175,0	180,0	105,0	110,0	110,0	100,0	4
Marrocos	130,0	120,0	100,0	130,0	120,0	130,0	110,0	140,0	4
Argélia	67,0	39,5	66,0	44,0	69,5	82,0	63,0	80,0	2
Portugal	62,9	76,2	59,2	91,6	90,0	109,1	69,4	78,8	3
Argentina	20,0	32,0	66,0	30,0	5,0	24,0	21,5	37,5	1
Chile	16,0	21,6	28,0	15,0	24,0	17,5	19,0	16,5	1
Austrália	18,0	19,0	9,0	18,0	12,0	20,0	21,0	21,0	1
França	6,0	3,0	5,0	5,0	2,0	5,0	5,0	5,0	0
Chipre	6,0	6,0	6,0	4,0	6,0	6,0	6,0	6,0	0
Croácia	5,0	5,0	4,0	4,0	1,0	6,0	4,0	5,0	0
Eslovénia	0,7	0,5	0,2	0,6	0,2	0,5	0,4	0,4	0
Malta				0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0
Outros	150,5	156,3	101,9	120,0	79,5	178,0	168,3	186,3	7

(*dados estimados)

(adaptado de COI,2018)

Nas últimas décadas verificou-se uma evolução da produção e do consumo mundial do azeite devido não só ao crescimento da produção nos países produtores como Espanha, Portugal e países do Norte de África, como também a um aumento do consumo de azeite nos principais países não produtores como os Estados Unidos, Brasil, Canadá, Japão, Rússia e Suíça. O crescente reconhecimento da qualidade do azeite do ponto de vista da nutrição e da saúde também

influenciou esta evolução tal como a diferenciação dos preços do azeite pela respetiva qualidade (Aviliez, 2016).

A produção de azeite na União Europeia tem crescido significativamente nos últimos anos, sendo Espanha o principal país produtor representando 51% da produção mundial, seguindo-se a Itália com 7%, a Grécia com 8% e os países da margem esquerda do Mediterrâneo com 15% (Tabela 1.1) (COI, 2018).

Na Figura 1.2 destaca-se a União Europeia que se tornou autosuficiente, após a adesão da Grécia e posteriormente de Espanha e Portugal, posicionando-se no plano internacional como o principal produtor, importador e exportador de azeite no mercado mundial (GPP,2007).

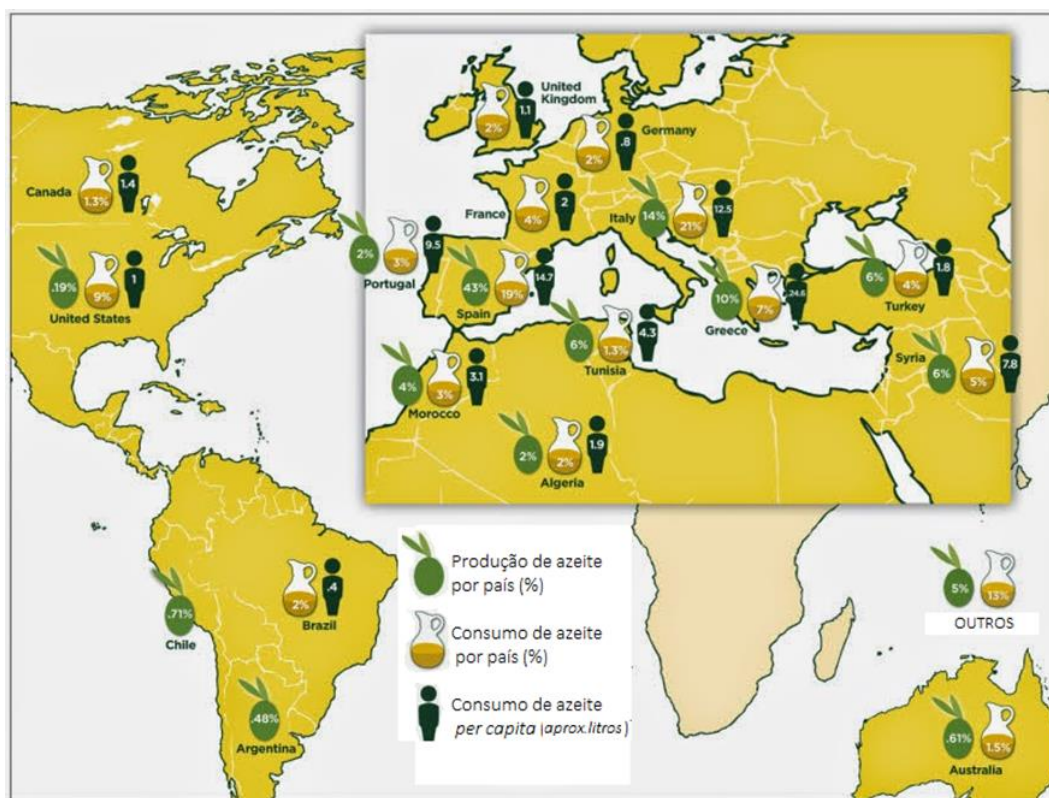


Figura 1.2 - Produção e consumo mundial de azeite (adaptado de Quora, 2018)

O número de lagares distribuídos pelos cinco continentes é de aproximadamente 12.000, sendo mais de 80% da extração do azeite efetuada através de sistemas de centrifugação (COI,2015).

Aos dias de hoje o azeite é consumido em cerca de 160 países, representando a União Europeia aproximadamente 55% do consumo mundial. Embora em países que tradicionalmente não eram consumidores, como os Estados Unidos da América, que sofreram um forte acréscimo nos últimos anos, pois na última década quase duplicaram o seu consumo, atingindo cerca de 306.000 toneladas anuais sendo o terceiro maior consumidor a nível mundial (Casa do Azeite, 2018).

O maior consumo de azeite *per capita* verifica-se nos países produtores, como se observa na Figura 1.3. Apesar da diminuição do consumo de 16,1 Kg relativamente a 2012 continuam a ser os gregos a população que mais consome azeite no mundo com 12,8 kg por pessoa, seguidos de Espanha com 11,3 kg, Itália com 10,5 kg e Portugal com 7,2 kg. Seguem-se Chipre (5,5 kg), Luxemburgo (3,2 kg por compras de supermercados de consumidores de países vizinhos), Malta (3 kg), França e Croácia (1,7 kg), Irlanda e Bélgica (1,4 kg) e Dinamarca (1,2 kg). No resto da União Europeia, os países são divididos pelos que consomem entre 1 kg e 0,5 kg por ano (por ordem descendente: Estónia, República Checa, Finlândia, Letónia, Alemanha, Países Baixos, Suécia, Eslovénia, Áustria e Reino Unido) e aqueles com menos de 0,4 kg (Roménia, Polónia, Hungria, Bulgária, Eslováquia e Lituânia)(COI,2018).

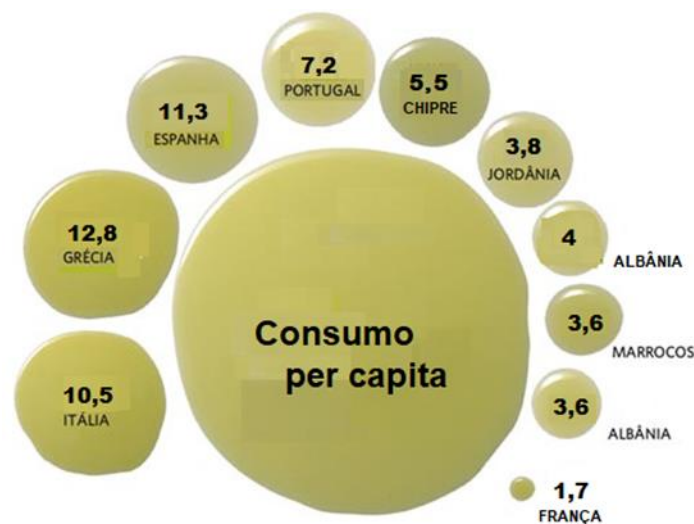


Figura 1.3 – Consumo de azeite *per capita* em 2014 (kg)
(adaptado de Oliveoilmarket, 2018)

Apesar do azeite ser a principal gordura nos países que praticam a dieta mediterrânica, continua a ser desconhecido em muitos locais do mundo. No entanto, verifica-se uma mudança em países como a Austrália, a China, os Estados Unidos e o Japão em que o azeite já está a ser

introduzido na alimentação e se incrementa fortemente o seu consumo e produção. Na última década verificou-se um crescimento médio de 0,6%, que reflete o efeito da difusão dos resultados da investigação científica sobre os benefícios do azeite para a saúde, bem como as sucessivas campanhas promocionais levadas a cabo, quer pela União Europeia, quer pelo Conselho Oleícola Internacional (Casa do Azeite, 2018).

O desenvolvimento de uma estratégia de qualidade para o azeite é um dos aspetos mais importantes das iniciativas da União Europeia, fundamental para o aumento da confiança dos consumidores e de consolidação do consumo dos países que a integram e nos países terceiros, exigindo o envolvimento de todos os agentes ligados ao processo produtivo e de comercialização, desde produtores, lagares, transformadores e operadores comerciais. Todavia, em muitas zonas da União Europeia, a olivicultura contribui positivamente para a manutenção do seu valor natural e paisagístico através de programas de desenvolvimento rural e regimes agro-ambientais (CE, 2012).

O Conselho Oleícola Internacional (COI), fundado em 1959, é a única organização mundial intergovernamental sob a tutela das Nações Unidas com o intuito de promover o consumo de azeite e regular a negociação de acordos de comércio internacional reunindo as partes interessadas na produção e consumo de azeite e azeitonas de mesa. A sua contribuição é decisiva no desenvolvimento sustentável da cultura do olival servindo como fórum mundial para discussão de questões de formulação de políticas e abordar desafios presentes e futuros (COI, 2018).

1.1.2 A NÍVEL NACIONAL

Em Portugal o olival é uma cultura com grandes tradições e importância determinante em vastas áreas do Continente. Tem associado à sua presença múltiplas funções e valias, que podem contribuir de forma importante para as regiões e populações onde se encontra (GPP,2007). A olivicultura nacional passou por diferentes etapas durante o período compreendido entre 1950 e 1988, em que a tendência era substituir a cultura da oliveira por outro tipo de cultura, o que originou um envelhecimento dos olivais com elevados custos de produção, provocando uma grave crise do sector oleícola. Esta situação reflete-se após o acentuado decréscimo verificado a partir da década de 60 até finais da década de 80, em que as produções da ordem das 90.000 toneladas de azeite atingiram valores médios de cerca de 35.000 toneladas (Casa do Azeite, 2018). A partir de 1986, com a entrada do país na União Europeia, iniciou-se a modernização do

sector, protegendo-se o olival e incentivando o aumento de novas superfícies, melhoria das tecnologias de produção, plantação de novos olivais intensivos e superintensivos, assim como um aumento da capacidade de transformação dos lagares (COI, 2017). Estas práticas efetuadas no decurso dos vários quadros comunitários de apoio, mantiveram-se relativamente pouco importantes, mesmo após o programa especial de 30 000 ha de novo olival autorizado a partir de 1998, invertendo-se esta situação em 2005 e 2006, com acréscimos significativos das áreas plantadas (GPP,2007).

O sector do azeite tem sido considerado estratégico no contexto do Programa de Desenvolvimento Rural Nacional pelo que se tem assistido nos últimos anos a uma recuperação da produção (GPP,2007). O olival é considerado uma atividade agrícola importante para Portugal, representando atualmente 95,5 milhões de euros, com um peso de 1,36% do valor da produção agrícola. O sector oleícola integra uma indústria de 1413 empregados (1,6% do total da indústria agroalimentar) e dispõe de mais de 495 lagares, 12 refinarias de azeite e 17 extratoras de óleo de bagaço de azeitona segundo as recentes informações de mercado do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2017).

A vocação predominante do setor português olivícola é a produção de azeite, com cerca de 96% da produção total, apenas 4% são destinadas a azeitona de mesa. O solo e o clima resultam nas condições adequadas a esta cultura e a significativa diversidade de cultivares fornecem uma base para a produção de azeite de excelente qualidade (Rebelo & Caldas, 2012). Estão reconhecidos como Denominação de Origem Protegida pela União Europeia seis azeites nacionais como se pode observar na Figura 1.4: Azeite de Moura, Azeite de Trás-os-Montes, Azeites do Norte Alentejano, Azeites da Beira Interior, Azeites do Ribatejo e Azeite do Alentejo Interior (GPP,2017).

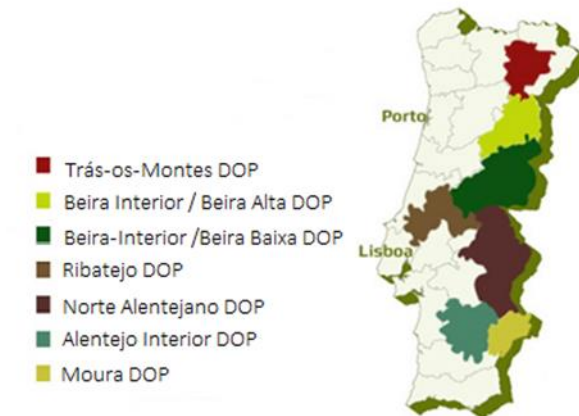


Figura 1.4 - Denominações de Origem Protegida do azeite em Portugal
(adaptado de AFGalimentar, 2018)

O olival nacional ocupa uma área global de 344 000 hectares, dos quais, mais de 6%, correspondem a olivais intensivos e super-intensivos, sendo a região do Alentejo preponderante, com 79% da produção nacional obtida, por via da recente instalação de novos empreendimentos hidroagrícolas. Para os próximos três anos estima-se um crescimento médio da produção da ordem dos 20% (GPP,2017). Segundo informações do COI, as principais cultivares são a Galega vulgar, que é a mais importante de Portugal, e a Cobrançosa, que apesar de autóctone da região de Trás-os Montes encontra-se difundida por todo o país. Também se destacam a Cordovil, a Verdeal de Serpa e a Madural. A partir da campanha de 2003/04, com as novas plantações de olival na região do Alentejo, verificou-se uma ocupação de cerca de 40% da superfície com cultivares como a Arbequina, Arbosana, Picual provenientes de Espanha e a Koroneiki proveniente da Grécia (COI, 2017).

A carência de água na região Alentejo tem sido uma das principais condicionantes ao seu desenvolvimento, impeditiva de uma modernização da agricultura e da sustentabilidade. Contudo, nos perímetros de rega da barragem do Alqueva, a cultura do olival é a mais importante, ocupando em 2017 cerca de 41.000 hectares, que correspondem a 57% da área inscrita beneficiada por este empreendimento. O potencial de crescimento da cultura mantém-se estável e prevê-se que o consumo mundial continue a aumentar na mesma proporção dos anos anteriores (EDIA, 2017). Na transformação, procedeu-se à concentração, modernização e adaptação tecnológica dos lagares, correspondendo às exigências da regulamentação comunitária em matéria de higiene e condições ambientais, tendo-se, desde meados da década de 90, passado de cerca de 1000 lagares para pouco mais de 600. Os lagares encontram-se

espalhados e relativamente bem localizados nas regiões de produção, fator que contribui favoravelmente para a obtenção de produtos de qualidade (GPP, 2007).

A Figura 1.5 demonstra a variação inter-anual da produção de azeite, justificada fundamentalmente pelos fenómenos de alternância de produção de azeitona.

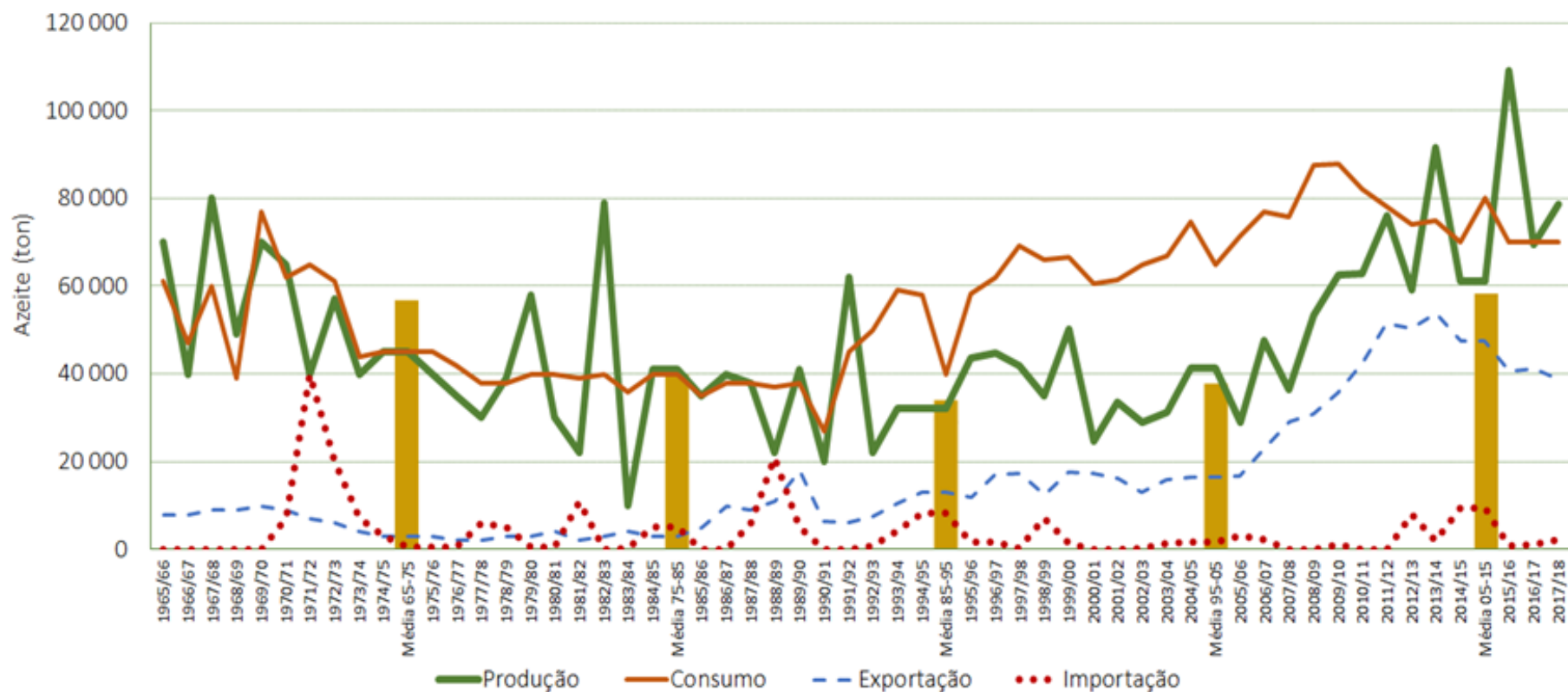


Figura 1.5 – Evolução do azeite em Portugal: produção, consumo, importação e exportação entre 1965 e 2017 e a produção média das últimas cinco décadas (em toneladas) (CAP,2017)

Pelos dados recolhidos pelo COI é possível verificar que na última década 2005-2015 a produção média de azeite em Portugal foi 57.970 toneladas, alcançando a maior produção na campanha de 2015/16 com 109.125 toneladas, das quais 78% correspondeu a azeite virgem extra (85.285 t), 17% a azeite virgem (19.095 t) e 4% a azeite lampante (4.745 t) (COI, 2017). As novas plantações realizadas nos últimos cinco anos conduzem o país a atingir uma produção estável superior às 100 mil toneladas (CONFAGRI, 2018).

Os preços à produção reflectem as oscilações da produção mundial/comunitária associada às condições climáticas e ao fenómeno de alternância da produção. Os anos com défice de produção, em que a oferta é reduzida face à procura, geram preços à produção mais elevados em relação a anos normais ou de excesso de produção (GPP, 2007).

O sector de transformação caracteriza-se por unidades de extração de azeite distribuídas por todo o país (Figura 1.6), que funcionam na sua maioria em regime industrial (67%), cooperativo (26%) e particular (6%), extraíndo respetivamente 61%, 35% e 3% do azeite produzido (GPP, 2007). O Alentejo é a principal região do território nacional que contribui com cerca de 78% do volume de azeite extraído na última campanha, com 49 lagares dos 137 que laboraram na campanha de 2017/2018 (GPP, 2007).

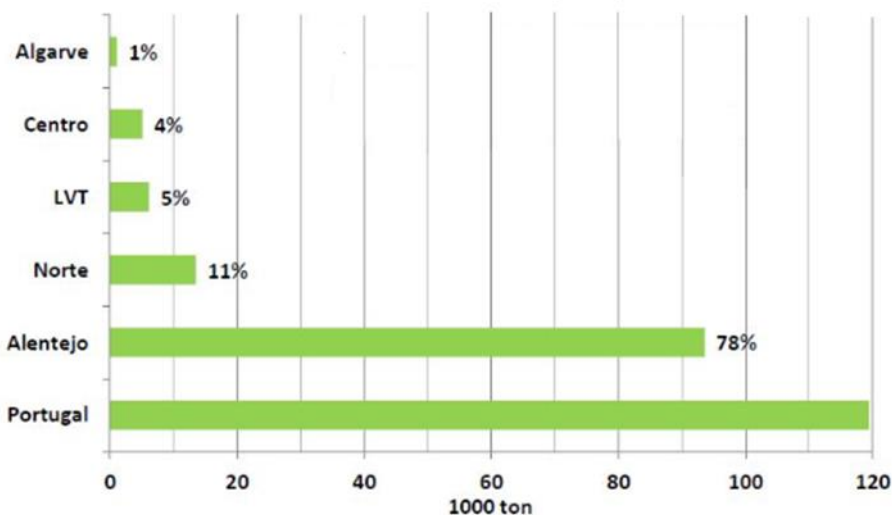


Figura 1.6 - Azeite extraído em Portugal por região (campanha 2017/18) (GPP, 2018)

Em Portugal verifica-se uma nítida recuperação no consumo de azeite por pessoa, comparativamente ao início da década de 90, com 2,6 kg. Este aumento de consumo não será

seguramente alheio ao reconhecimento do azeite como produto natural, saudável e com inúmeros benefícios para a saúde humana (Casa do Azeite, 2018). O índice de consumo *per capita* nacional é bastante pequeno, como se observa na Tabela 1.2, quando comparado com outros países produtores membros da União Europeia e longe dos 10,5 kg de consumo relatados durante a década de 60 (Rebelo & Caldas, 2012).

Tabela 1.2 – Evolução do consumo de azeite per capita entre 2005 e 2015

Rubrica	Unidade	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015*
Produção	10 ⁶ tonelada	33	41	35	50	61	63	74	63	85	67	99
Consumo	10 ⁶ tonelada	65	69	71	77	81	82	78	78	79	77	78
Consumo <i>per capita</i>	kg por habitante por ano	6	7	7	7	8	8	7	7	8	7	8
Grau de auto- aprovisionamento	%	50,3	63,3	49,3	64,9	75,3	76,8	94,9	80,8	107,6	87,0	126,9

Fonte: GPP, 2017

Portugal, nas décadas de 50 e 60 apresentou níveis de auto-aprovisionamento acima dos 100 %. Desde esse período até aos dias de hoje, esta capacidade diminuiu e a produção nacional de azeite apenas satisfaz cerca de 50 a 60% das necessidades de consumo, sendo os restantes 40 a 50 % assegurados pela importação a países comunitários, principalmente Espanha (INE, 2018).

Desde 2006 as exportações cresceram a uma taxa média anual de 20%. Atualmente, Portugal também exporta uma parte da produção nacional, como se pode verificar durante a campanha de 2015/16, em que as exportações aumentaram 8% em relação à campanha anterior alcançando um volume total de 137.145,1 toneladas das quais 69% correspondem a vendas intracomunitárias cujo destino, como ilustra a Figura 1.7, são principalmente Espanha, Itália e França. O destino principal das exportações extra-comunitárias é o Brasil com 24% do total exportado seguido de Angola com 3%. (COI, 2018). O aumento da procura pelos mercados americano e africano é um estímulo para o crescimento do sector do azeite português, uma vez que proporciona uma alternativa ao mercado da União Europeia (Rebelo & Caldas, 2012).

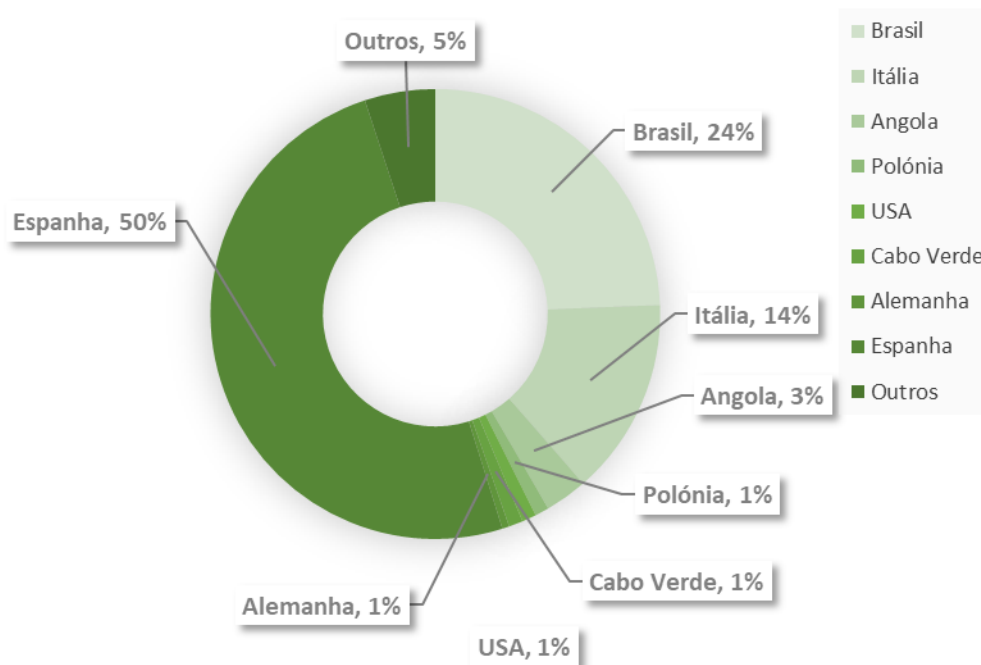


Figura 1.7 – Principais destinos das exportações de azeite em Portugal (2015/16) (COI, 2017)

No setor agroalimentar este produto representou em 2015 cerca de 6,8% das exportações, evolução muito positiva do índice de orientação exportadora, com valores superiores aos 200% nos últimos anos, revelador de um desempenho notável desta indústria (GPP,2017).

Durante 2017 as cotações do azeite virgem extra embalado variaram entre 4,23 €/litro e 4,80 €/litro e as de azeite virgem entre 4,00 €/litro e 4,70 €/litro (SIMA, 2018). De acordo com o Pool.red (2018), de outubro a novembro de 2018, o kg de azeite virgem extra oscilou entre 2,48 € e 3,15 € e o azeite virgem 2,30 € e 2,30 € .

Ao nível do processamento, o setor cooperativo tem um peso significativo, mas decrescente, tendo contribuído a entrada de grupos económicos de propriedade privada de investidores em todos os setores da fileira, desde a produção à comercialização. Para melhorar o desempenho do mercado das cooperativas de azeite são necessários grandes esforços para posicionar os seus produtos no mercado com a sua própria marca e poder competir, através de estratégias apropriadas no mercado de qualidade, incluindo a internacionalização. A estratégia seguida na última década pelas maiores empresas do sector envolve unidades maiores através de fusões e aquisições, cooperativas secundárias, alianças e outras formas de associação, investimentos em instalações e equipamentos de modernização, embalagens, I & D e inovação. (Rebello & Caldas, 2012).

1.2 A AZEITONA

1.2.1 COMPOSIÇÃO DA AZEITONA E SUA FORMAÇÃO

O fruto da oliveira, a azeitona, é uma drupa cujo tamanho é variável dependendo essencialmente, entre outros fatores, da variedade, das condições edafo-climáticas e das práticas de cultivo. Na azeitona podem distinguir-se três tecidos principais (Figura 1.8). O epicarpo, representa entre 2 e 2,5% do peso do fruto, é o tecido superficial que tem como função o seu revestimento. O mesocarpo, representa entre 70 e 80% do peso do fruto, é a polpa ou parte carnosa da azeitona. O endocarpo ou caroço, representa entre 15 e 23 % do peso do fruto, em cujo interior se encontra a semente com o embrião. Ao conjunto destes três tecidos denomina-se pericarpo (Beltran *et al.*, 2004).



Figura 1.8- Esquema da secção da azeitona (a) e do caroço (b) (adaptado de García, 2018)

A composição global do fruto é aproximadamente 50,0% em água, 22,0% de azeite, 19,1% em açúcares, 5,8% em celulose, 1,6% em proteínas e 1,5% em cinzas (Kiritsakis, 1992). Os componentes maioritários da polpa e da semente são a água e o azeite. A água representa 50-60% do peso da polpa, 30% da semente e 9% do caroço. O azeite representa 20-30% da polpa, 27% da semente e 1% do caroço. Outros componentes quantitativamente importantes na composição da polpa são os açúcares redutores que podem alcançar 3 a 4%, destacando-se a glucose, a frutose e a sacarose. Os polissacáridos podem alcançar 4% entre eles a celulose, a lenhina e a hemicelulose. Nas proteínas o aminoácido mais importante que as constitui é a arginina. Outros componentes minoritários da polpa, representam 1 a 3%, são compostos fenólicos. (Kiritsakis,1992).

O peso da azeitona pode variar entre 0,5 e 20 gr no estado final da maturação. Durante a maturação a azeitona altera a sua cor, em que inicialmente é verde, tornando-se amarelada e, em seguida, assume uma cor roxa característica, particularmente intensa quando madura. O processo de maturação ocorre durante um período de tempo que varia de acordo com as cultivares e as condições climáticas (Bassi, 2014).

O crescimento da azeitona apresenta uma curva sigmoideal, demorando aproximadamente 200 dias. Após a fecundação ocorre um rápido processo de divisão celular, visível apenas 10 a 15 dias depois. Durante esta primeira fase (fase I) termina a divisão celular da maior parte dos tecidos presentes na azeitona. O endocarpo (caroço) é o tecido que apresenta maior desenvolvimento, podendo alcançar até 80% do volume do fruto. O processo decorre até Julho com a esclerificação e endurecimento do endocarpo. A área do endocarpo não apresenta diferenças significativas relativamente a árvores em regadio, observando-se um atraso no seu crescimento (Rapoport *et al.*, 2004).

Durante a fase II o crescimento do fruto é mais lento, até o embrião e o endocarpo alcançarem o seu tamanho final, terminando com o endurecimento do caroço. Durante a fase III dá-se um crescimento rápido do fruto devido ao aumento das células do mesocarpo, que determina o tamanho final do fruto. Durante esta fase começa a biossíntese do azeite e a sua acumulação nas células parenquimatosas da polpa (lipogénese). A disponibilidade de água nesta fase determina o tamanho final do fruto e o seu conteúdo em azeite, dando lugar em condições de 'stress hídrico' a frutos mais pequenos e conteúdos mais baixos em azeite. Esta fase termina no início do Outono quando os frutos sofrem as primeiras mudanças de cor. Neste momento a semente alcança um alto poder de germinação, que posteriormente se reduz quando os frutos apresentam cor negra (Rapoport *et al.*, 2004).

A acumulação de azeite ou lipogénese inicia-se após o endurecimento do caroço, coincidindo com o crescimento do fruto (Lavee, 1996). A quantidade de azeite presente na polpa depende de múltiplos fatores, entre os quais cabe destacar a variedade, o estado de maturação do fruto, as condições climáticas e o regime de cultura (sequeiro ou regadio) (Ortega *et al.*, 2004).

Após a fase III, o crescimento do fruto e a acumulação de azeite reduzem-se de forma notável levando-se a cabo os processos finais de maturação. Uma vez que a polpa alcança o tamanho definitivo, o fruto pode apresentar oscilações no seu peso como consequência das

flutuações da humidade devidas às condições ambientais (pluviometria e regime de geadas) (Ruiz, 1999; Beltran *et al.*, 2004).

1.2.2.VARIEDADES DA AZEITONA

Atualmente os olivais tradicionais dão lugar a novas plantações com variedades que apresentam melhores características para a produção de azeite. No entanto, o risco de desaparecimento dos recursos genéticos selecionados pelo homem é menor do que noutras espécies. A presença de olivais tradicionais e a longevidade da espécie garantem a médio prazo a diversidade genética (COI, 2000). Existem muitas variedades de azeitona, tanto para o consumo em verde como para a produção de azeite, sendo que descreveu 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal, importantes pelo seu valor ou área de cultivo e algumas de origem espanhola (Leitão *et al.*, 1986; Inês, 2015). Neste trabalho optou-se por abranger as mais representativas nas plantações atuais na região do Alentejo, incluindo variedades de origem nacional e espanhola, que são caracterizadas de uma forma breve.

Variedades de origem portuguesa

A *Blanqueta de Elvas*, sinónimas 'Blanqueta' e 'Branquita', é cultivada principalmente no Alentejo e, tem alguma representatividade, no Ribatejo. Árvore de porte erguido, de vigor reduzido e densidade média, começa a frutificar cedo e com regularidade, mas exige solo fértil. Apresenta maturação não simultânea. Os frutos têm peso médio, forma esférica e simétrica. Os endocarpos são ovóides com o ápice arredondado e a base pontiaguda. A entrada em produção é precoce, a produtividade é elevada e constante. A época de maturação é média e a força de retenção é relativamente elevada, o que dificulta a mecanização da colheita. Resistente ao olho de pavão (*Spilosea oleaginae* (Castagne)) e tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah & Grimont.), não é muito sensível aos ataques de mosca-da-zeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)). É uma cultivar de dupla aptidão, ou seja, é utilizada para azeite e conserva tanto em verde como em negro. O rendimento em azeite é alto, entre 22 a 24%, rico em ácido linoleico (Leitão *et al.*, 1986; COI, 2000; Inês, 2015). Esta variedade está incluída na DOP Azeites do Norte Alentejano (DGADR, 2018).

A *Cobrançosa*, sinónimas 'Quebrançosa' e 'Salgueira', é uma variedade transmontana, bastante regular e produtiva, cultivada nas principais regiões olivícolas nacionais. A árvore

apresenta vigor vegetativo médio, arborescência média e porte aberto. Os frutos têm peso médio de aproximadamente 4 g, forma alargada e assimétrica. Os endocarpos são elípticos com o ápice e a base pontiagudos. É uma cultivar com entrada em produção média, muito produtiva e regular. A época de maturação é média e apresenta baixa resistência ao desprendimento o que facilita a colheita por vibração. A suscetibilidade à gafa (*Colletotrichum spp.*) é baixa e média para a tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah & Grimont.) , o olho de pavão (*Spilocea oleaginae* (Castagne)) e mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)). É uma cultivar de dupla aptidão, ou seja, é utilizada para azeite e conserva em verde. Apresenta rendimento médio em azeite, entre 18 a 22%, de mediana riqueza em ácido linoleico (Leitão *et al.*, 1986; COI, 2000; Inês, 2015) Esta variedade está incluída nas DOP Azeites de Trás-os-Montes, Azeites de Beira Alta, Azeites do Norte Alentejano e Azeites do Alentejo Interior (DGADR, 2018).

A *Cordovil de Serpa*, sinónimo 'Cordovil de Moura', é cultivada essencialmente no Alentejo. A árvore apresenta vigor vegetativo baixo a médio, arborescência média a densa e porte aberto. Os frutos têm peso médio, forma ovóide e ligeiramente simétrica. Os endocarpos são elípticos com o ápice arredondado e a base pontiaguda. É uma cultivar com entrada em produção precoce, muito produtiva, porém alternante. A época de maturação é média. É muito suscetível à tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, AbuGhorrah & Grimont) e resistente à mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)). A separação da polpa do caroço é fácil. É uma cultivar de dupla aptidão, utilizada para azeite e conserva em verde. O rendimento em azeite é médio entre 18 a 22%. (Leitão *et al.*, 1986; Guerrero, 1997; COI, 2000; Barranco, 2004; Inês, 2015). O azeite é muito apreciado pelo elevado conteúdo em ácido oleico e simultaneamente, baixo em ácido linoleico, o que lhe confere uma boa relação AGMI/AGPI (COI,2000; Baer, 2015). Esta variedade está incluída na DOP Azeite do Alentejo Interior e DOP Azeite de Moura. (DGADR, 2018).

A *Galega vulgar*, sinónimo 'Galega', 'Galega miúda', 'Molar', 'Negrucha' e 'Coimbreira', é cultivada em todas as regiões olivícola nacionais. A árvore apresenta vigor vegetativo médio, arborescência densa e porte erguido. É considerada uma variedade produtiva, porém muito alternante. É apreciada pela sua tolerância à secura. É sensível ao frio, à salinidade e ao calcário. Tem média aptidão ao enraizamento e é considerada um bom porta-enxerto para outras variedades (Leitão *et al.*, 1986; COI,2000; Barranco 2004). A época de maturação é muito temporã e escalonada. Os frutos têm peso baixo, inferior a 2 g, apresentam forma ovóide e

ligeiramente assimétrica, têm baixo teor em azeite e elevada resistência ao desprendimento, o que dificulta a colheita mecânica. Os endocarpos são elípticos com o ápice e a base pontiagudos. A rusticidade da ‘Galega vulgar’ é uma das características responsáveis pela sua grande expansão territorial. É uma cultivar de dupla aptidão, ou seja, é utilizada para azeite e conserva em negro. O rendimento em azeite é baixo, inferior a 18% (Leitão *et al.*, 1986; Guerrero, 1997; COI, 2000; Barranco, 2004; Inês, 2015). O azeite apresenta um elevado teor em ácido palmítico e palmitoleico e menor teor em ácido linoleico, tal como uma relação AGMI/AGPI mais elevada, sendo esta a principal razão da sua grande resistência à degradação oxidativa durante o armazenamento. No que respeita à composição em antioxidantes naturais apresenta um baixo teor em compostos fenólicos totais, verificando-se a tendência para ter um teor mais elevado em tocoferol (Baer, 2015). Esta variedade apresenta baixas taxas de enraizamento pelo método convencional (estaca semi-lenhosa). Resistente à verticilose do olival (*Verticillium dahliae* Kleb.) mas susceptível à tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah & Grimont.), à mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)), à traça-da-oliveira (*Prays oleae* (Bern.)), à gafa (*Colletotrichum* spp.), à cochonilha-negra (*Saissetia oleae* (Bern.)) e à fumagina (Leitão *et al.*, 1986; Guerrero, 1997; Barranco, 2004; COI, 2000; Inês, 2015). Esta variedade está incluída na DOP Azeite da Beira Alta, DOP Azeite da Beira Baixa, DOP azeite do Ribatejo, DOP Azeite do Alentejo Interior, DOP Azeite do Norte Alentejano e DOP Azeite de Moura (DGADR, 2018).

A *Verdeal de Serpa*, sinónimo ‘Verdeal Alentejana’ e ‘Verdial de Huevar’ em Espanha, é cultivada essencialmente no Alentejo. A árvore apresenta vigor vegetativo médio, arborescência densa e porte erguido. Os frutos têm peso elevado, forma ovóide e ligeiramente assimétrica, com lenticelas abundantes e pequenas. Os endocarpos são ovóides com o ápice arredondado e a base pontiaguda. É uma cultivar com entrada em produção tardia, produtividade baixa e alternante. A época de maturação é muito tardia, tanto que o seu fruto não atinge a cor negra, daí a denominação Verdeal. A sua resistência ao desprendimento é muito elevada o que dificulta a colheita mecânica. É pouco suscetível à tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah & Grimont.), à mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)), ao olho de pavão (*Spilotea oleaginae* (Castagne)) e verticilose do olival (*Verticillium dahliae* Kleb.). É uma cultivar de dupla aptidão, ou seja, é utilizada para azeite, conserva em verde do tipo conserva artesanal britada e para conserva em negro por oxidação, devido à textura firme da polpa. O rendimento em azeite é alto, superior a 22% (Leitão *et al.*,

1986; COI, 2000; Inês, 2015). Esta variedade está incluída na DOP Azeite de Moura (DGADR, 2018).

Variedades de origem espanhola

A *Arbequina*, sinóníma 'Arbequí', 'Arbequín', 'Blancal', oriunda da Catalunha, é uma das principais variedades de oliveira cultivadas em Espanha (Rallo, 2002) e em Portugal é cultivada essencialmente no Alentejo e Ribatejo. É resistente ao frio e suscetível à clorose férrica em terrenos muito calcários (Guillén & López-Villalta, 1992; Barranco, 2004). Esta variedade é muito suscetível às condições de cultura em regime de sequeiro (Ortega *et al.*, 2004). Apresenta baixo vigor vegetativo e arborescência média. O seu porte arbustivo permite maiores densidades de plantação, sendo utilizada em sistemas de plantação intensivo e superintensivo. Os frutos têm peso baixo, forma esférica e ligeiramente simétrica. O tamanho reduzido dos frutos dificulta a sua colheita mecânica pelo que dificultam a transmissão da vibração durante a colheita mecânica. Os endocarpos são ovóides com o ápice e a base arredondados. A entrada em produção é muito precoce, muito produtiva e regular. A época de maturação é média, escalonada não alcançando a pigmentação completa do fruto (Hermoso *et al.*, 1997; Humanes *et al.*, 1992). É pouco suscetível à gafa (*Colletotrichum spp.*), enquanto apresenta suscetibilidade média ao olho de pavão (*Spilosea oleaginae* (Castagne)) e sensível à mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)) e verticilose do olival (*Verticillium dahliae* Kleb.). É uma cultivar utilizada para azeite com rendimento alto, superior a 22%, e qualidade excelente pelas suas características organoléticas, muito frutado. Caracteriza-se pela sua fluidez e aroma ligeiramente amargo e um picante quase impercetível (Mansouri *et al.*, 2014), no entanto apresenta baixa estabilidade (Barranco *et al.*, 1994; Guerrero, 1997; COI, 2000; Barranco, 2004, Rosa *et al.*, 2006), pelo seu baixo teor em antioxidantes e ácido oleico e teores elevados de ácidos gordos poli-insaturados como o ácido linoleico e palmítico (Rondanini *et al.*, 2011). O azeite apresenta uma elevada percentagem de ácido palmítico (16,42 %) e ácidos gordos saturados (19,02 %AGS) e uma baixa percentagem de ácidos gordos monoinsaturados (67,89 % AGMI) e baixo conteúdo em ácido oleico (65,67 %) e elevada percentagem em ácido linoleico (12,54 %). Um baixo nível de antioxidantes (286,51 mg/kg), o que se traduz numa baixa estabilidade oxidativa (53,78 h) (Mansouri, 2014).

A *Picual*, sinóníma 'Andaluza', 'Blanco', 'Fina', 'Jabata', 'Nevadillo', 'Picúa', 'Salgar', 'Temprana', é a variedade mais importante de Espanha dominando as províncias de Jaén,

Córdoba e Granada, sendo a base das novas plantações. Em Portugal é cultivada essencialmente no Alentejo e Ribatejo. A árvore apresenta vigor vegetativo médio, arborescência densa e porte aberto. Os frutos têm peso médio, forma ovóide e assimétrica, de cor avermelhada na viragem e negro na maturação. Os endocarpos são elípticos com o ápice pontiagudo e a base arredondada. É uma cultivar com entrada em produção precoce, muito produtiva e regular. A época de maturação é média. É uma cultivar utilizada para azeite com rendimento superior a 22%. Produz um azeite muito estável, (Barranco *et al.*, 1994). Elevados teores em ácido oleico (Rondanini *et al.*, 2011). A variedade Picual é a principal cultivar espanhola, de elevada produtividade e com fraca difusão em Portugal (Leitão *et al.*, 1986), sendo muito apreciada pela rápida entrada em produção, elevada produtividade e facilidade de cultivo. Produz azeite de qualidade média, mas de grande estabilidade e com elevado conteúdo em ácido oleico (78,93%) (Guillén & López Villalta, 1992; Guerrero, 1997; Herrera *et al.*, 1999; Barranco, 2004; Rondanini *et al.*, 2011), e baixo em ácido linoleico (Leitão *et al.*, 1986). É tolerante à tuberculose (*Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (Smith) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah & Grimont) (Leitão *et al.*, 1986; Guerrero, 1997; Herrera *et al.*, 1999; Barranco, 2004), mas muito suscetível ao algodão-da-oliveira (*Euphyllura olivina* (Costa.)) e verticilose do olival (*Verticillium dahliae* Kleb.) (Barranco *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 1999; Barranco, 2004). Segundo Leitão *et al.* (1986) e Guerrero (1997) é suscetível à mosca-da-azeitona (*Bactrocera (=Dacus) oleae* (Gmelin)), ao olho de pavão (*Spilotea oleaginea* (Castagne)), cochonilha negra (*Saissetia oleae* (Bern.)) e traça-da-oliveira (*Prays oleae* (Bern.)). Os frutos apresentam baixa resistência ao desprendimento, mas queda reduzida o que a torna apropriada à colheita por vibração (Leitão *et al.*, 1986; Guillén & López-Villalta, 1992; Guerrero, 1997). O fruto normalmente não é utilizado para conserva (Leitão *et al.*, 1986).

1.3 OBTENÇÃO DE AZEITE VIRGEM

O processo de obtenção de azeite virgem abrange um conjunto de operações mecânicas e/ou físicas que sob determinadas condições permite a separação da componente gordurosa dos restantes constituintes da azeitona.

As operações fundamentais dos vários tipos de processo industrial são apresentadas na Figura 1.9 e descritas de uma forma sucinta. O sistema de extração atualmente mais utilizado é o sistema contínuo de duas fases representando no território nacional cerca de 48% dos 462 lagares existentes durante a campanha 2017/2018 (INE, 2018).

Um azeite virgem de qualidade é obtido a partir de azeitonas da árvore, separadas das azeitonas recolhidas do chão, isentas de pragas e doenças, que se encontrem no momento ótimo de maturação, recém colhidas e com exigências de higiene e condições adequadas no material em contacto. As azeitonas deverão ser transportadas de forma a evitar danos físicos por práticas de manipulação incorretas, contentores inadequados ou carga excessiva que originam nos frutos transformações enzimáticas inadequadas que causam ao longo do tempo alterações organoléticas como a perda do característico aroma a frutado fresco (Garcia-Gonzalez& Aparício, 2010).

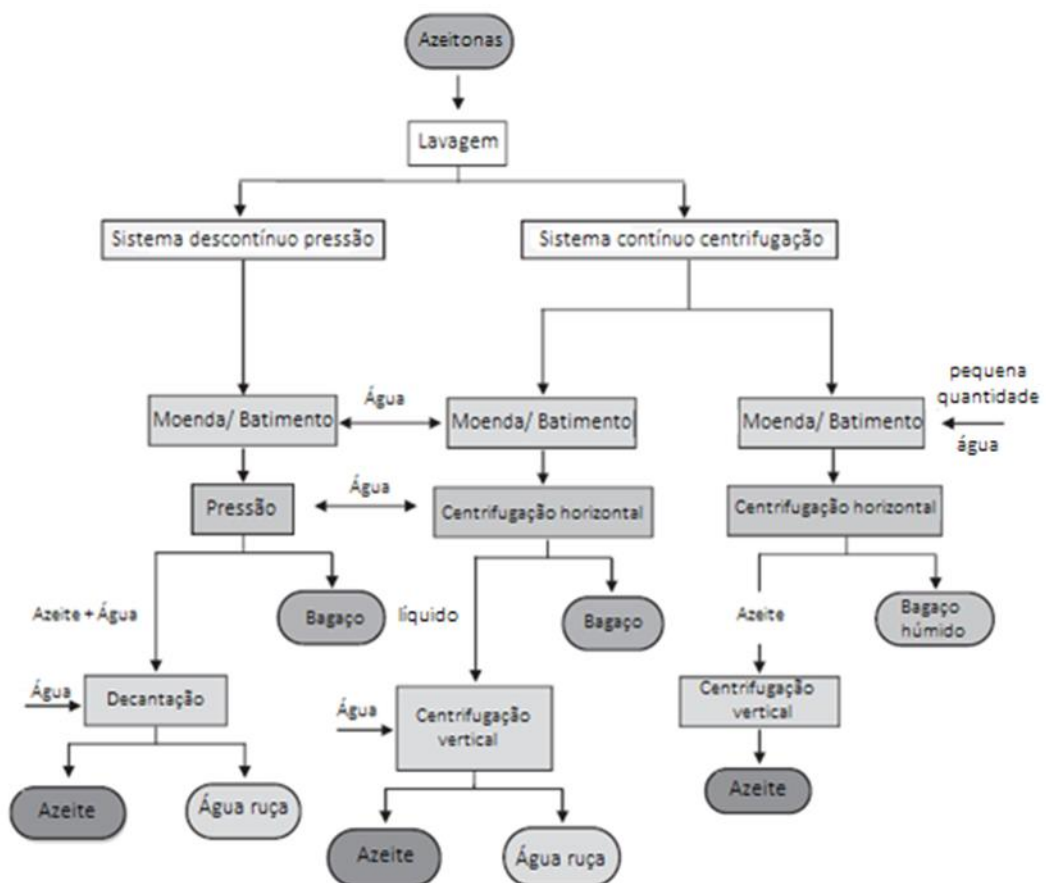


Figura 1.9 - Sistemas de extração do azeite (adaptado de Dermeche *et al.*, 2013)

A receção da azeitona no lagar deve ocorrer em função da qualidade dos frutos, existindo vários pontos de descarga independentes, em que se podem realizar controlos de identificação, valorização e grau de impurezas. A operação de eliminação de impurezas por ar projetado não afeta normalmente as características de qualidade das azeitonas desde que a eficácia de eliminação de folhas e ramos seja elevado, caso contrário incrementam-se ao azeite aromas a

folha, verde, amargo, áspero e adstringente. O processo de lavagem com água pode interferir em função do estado físico dos frutos, do grau de escorrência e do estado de limpeza da água. Esta operação pode originar um ligeiro aumento de acidez e uma sensação organolética a humidade. É recomendável que o período de receção das azeitonas no pátio não exceda as 24 horas, caso se verifique as azeitonas devem ser separadas (COI,2006).

Como consequência do grau de humidade próprio da azeitona e da sua evolução biológica, durante o armazenamento inicia-se o processo de fermentação da matéria orgânica que resulta na desintegração da estrutura celular, produzindo-se durante este tempo um conjunto de reações hidrolíticas e lipolíticas, enzimáticas endógenas e microbianas, induzidas pela ação de fungos e leveduras que se desenvolvem conjuntamente e afetam a qualidade e características organoléticas do azeite originando aromas típicos de tulha, fungos, humidade, terra que realçam e identificam a causa da degradação no azeite durante o período de armazenamento da azeitona (COI,2006).

A utilização de depósitos pulmão de grande capacidade de acumulação de azeitonas antes do processamento pode originar mistura de azeitonas frescas com azeitonas com tempos de espera longos. A obtenção de azeite implica a rutura das células da azeitona para permitir a saída da gordura e a sua coalescência em gotas de maior dimensão. Devido à elevada quantidade de gordura e à estrutura da azeitona as ações mecânicas utilizadas devem ser cuidadas para obter um produto de qualidade (COI,2006).

A trituração das azeitonas permite romper a estrutura da azeitona e provocar a saída das gotas de azeite dos vacúolos. São utilizados moinhos metálicos com crivos que permitem regular a granulometria da pasta e descarregar a azeitona. Na maioria dos lagares este processo é realizado por moinhos de martelos metálicos, para os quais se deve ter atenção especialmente ao tipo de material das pastilhas e dos crivos que devido à sua ação, são peças de elevado desgaste e podem transferir ligações metálicas à massa moída atuando como catalisadores da oxidação do azeite, provocando alterações de cor da massa e no azeite, podendo iniciar-se a sensação organolética de metálico. Além disso, como consequência da alta velocidade da ação dos moinhos durante este processo todos os constituintes da azeitona se interacionam provocando além de um elevado arejamento, fatores que modificam com determinada intensidade as características originais do azeite no fruto (Fedeli, 1996).

O *batimento da pasta* tem como objetivo reunir as gotas dispersas da pasta moída em gotas maiores e separá-las das outras fases (fase sólida e fase líquida aquosa). Este processo é efetuado através de uma bateadeira, equipada com um sistema térmico que permite o aquecimento controlado e adequado da pasta durante um determinado período de batimento lento e contínuo. Durante esta operação e em função do estado de maturação, variedade e grau de humidade, pode favorecer-se a formação de emulsões na massa moída e como consequência a constituição de massas fluentes que vão dificultar a operacionalidade dos restantes processos de elaboração, a não ser que se corrija esta situação com a utilização de adequados coadjuvantes tecnológicos. Nesta fase do processo pretende-se reunir o maior número de gotas de azeite dispersas na massa moída formando uma película sobrenadante. Os fatores que influenciam a qualidade são o tempo, a temperatura e os coadjuvantes tecnológicos. Com a ação da temperatura, que não deve atingir os 30°C, esta etapa é fundamental na preparação da massa da azeitona para a seguinte fase de separação sólido-líquido. Geralmente os tempos de batimento da massa rondam os 90 minutos e dependem do estado da massa batida pelos moinhos de martelo. Nesta fase produzem-se fenómenos de intercâmbio entre os constituintes da massa moída, que até este nível de temperatura têm baixa repercussão nas características organolépticas, mas que a temperaturas e tempos superiores aumentam a velocidade de reação de todos esses processos de intercâmbio e degradação dos componentes responsáveis dos aromas frutados e harmónicos podendo surgir um conjunto de defeitos a cozido, queimado e que em função do tempo de preparação podem detetar-se como fundo aromático, a sensação a madeira, bagaço ou água ruça, como consequência de outros constituintes da massa. (COI,2006).

O processo de *separação sólido-líquido* das fases azeite, bagaço e fase aquosa, pode ser realizado com o sistema por *percolação*, mediante um procedimento que utiliza o efeito da tensão interfacial do azeite sobre uma lâmina ou malha de aço inoxidável que separa o azeite da massa batida; *por pressão*, mediante o efeito de uma prensa hidráulica na massa batida previamente distribuída manual ou mecânicamente em capachos, para permitir a separação do mosto oleoso (azeite e água de vegetação) da fração sólida; *por centrifugação*, mediante o efeito da força centrífuga que gera o decantador centrífugo horizontal (decanter), que permite separar os componentes da massa de azeitona batida em função da sua densidade. Existem dois tipos de decanter, dependendo da saída dos produtos durante a centrifugação, quando a separação é intermitente e descarregam os três componentes (azeite, bagaço e água ruça) denomina-se *de três fases ou três saídas*; quando a separação dos três componentes se realiza internamente e só

permite a descarga independente do azeite e do conjunto bagaço e água de vegetação, denomina-se *de duas saídas ou duas fases* (COI,2006).

O processo de *separação líquido-líquido* da fase azeite e fase aquosa, é realizado por centrifugação mediante um procedimento que utiliza a força centrífuga para separar o azeite da fração aquosa através de um equipamento denominado separadora centrífuga vertical. A decantação natural ocorre mediante a separação nos depósitos de decantação dos componentes do mosto oleoso - azeite, água e fragmentos de materiais sólidos, por diferença de densidade e de imiscibilidade dos componentes (COI, 2006).

Na *decantação* procede-se à classificação do azeite antes de ser destinado ao armazém. O processo de decantação tem como objectivo homogeneizar o azeite, eliminar a fração de ar ocluída durante a centrifugação, eliminar as espumas sobrenadantes e os fundos de decantação permitindo classificar o azeite em função das suas características físico-químicas e organolépticas. (COI;2006). No armazém, o azeite é mantido em depósitos de material inerte com fundo cónico para facilitar a decantação, pois o azeite nesta fase ainda possui uma certa humidade e impurezas que precipitam ao longo do tempo, fermentam e acrescentam ao azeite odores e sabores estranhos. Periodicamente são efectuadas purgas para eliminar esse material dos depósitos. (Alba, 1998).

O azeite fica então preparado para ser *embalado*, podendo ser *filtrado*, em recipientes que assegurem a sua integridade. A embalagem deve oferecer proteção em relação aos fatores externos, para evitar contaminações microbiológicas e a propagação de reações indesejadas, causadas pela presença de luz e oxigénio. Após o embalamento o produto deve ser armazenado a temperaturas entre 15 e 18º C para evitar a degradação prematura do produto (Alba, 1998).

Atualmente os investigadores procuram alternativas de produção com o objetivo de diminuir os impactos ambientais dos resíduos gerados durante a produção, pois a cada ano que passa as normas ambientais estão cada vez mais rígidas promovendo produções eficientes e não poluentes. Deste modo, novas tecnologias de produção aplicadas a estes resíduos favorecem a utilização crescente destes como sub-produtos (García-González & Aparicio, 2010).

Os métodos de extração mais modernos utilizam a extração em duas fases, diminuindo a produção de água ruça e por conseguinte a obtenção do bagaço húmido que é utilizado para

extração de óleo do bagaço. Já existem formas de utilização da água ruça na irrigação e fertilização do solo. Porém, neste caso, existem algumas restrições legais quanto à quantidade a utilizar (García-González & Aparicio, 2010).

1.4 O AZEITE

1.4.1 CLASSIFICAÇÃO DO AZEITE

As denominações do azeite e do óleo de bagaço de azeitona adotadas pelos países pertencentes às Nações Unidas são indicadas abaixo e constam do “Acordo Internacional 2015 do azeite e azeitona de mesa” (CNUCED, 2016) e encontram-se descritas no Regulamento (CE) nº 1234/2007 do Conselho de 22 de outubro. Os limites das características físico-químicas e organoléticas estabelecidos pelo Regulamento de Execução (UE) 1348/2013 de 16 de dezembro, estão em anexo neste documento (Anexo I e II), correspondendo à norma comercial do Conselho Oleícola Internacional.

1) *Azeite virgem* – azeite obtido a partir do fruto da oliveira (*Olea europae* L.) unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições nomeadamente térmicas que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração. O azeite virgem é objeto de classificação e das seguintes denominações:

a) Azeite virgem próprio para consumo imediato: *Azeite virgem extra e Azeite virgem*

b) Azeite virgem que necessita de um tratamento antes do seu consumo: *Azeite virgem lampante*, azeite virgem que se destina à refinação com vista à sua utilização para consumo humano.

2) *Azeite refinado* – azeite obtido por refinação de azeite virgem.

3) *Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem* são próprios para consumo imediato e designado por *Azeite*.

As denominações do óleo de bagaço de azeitona incluem o óleo de bagaço de azeitona bruto, o óleo de bagaço de azeitona refinado e o óleo de bagaço de azeitona obtido por loteamento de óleo de bagaço de azeitona refinado e de azeite virgem.

Segundo a legislação apenas podem ser destinados ao consumo final o azeite virgem extra, o azeite virgem e o azeite. O azeite virgem lampante só pode ser utilizado para fins comestíveis após ser refinado e loteado para a obtenção de tipo comercial azeite.

No mercado podem encontrar-se vários tipos de azeite identificados pela rotulagem como:

Azeite proveniente de agricultura biológica, tem origem em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico tal como o processo de obtenção do azeite previsto pela regulamentação europeia (DGADR, 2018).

Azeite de Denominação de Origem Protegida (DOP), nome geográfico ou equiparado que designa e identifica um produto originário de determinado local ou região, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente ao meio geográfico específico, incluindo fatores naturais e humanos, cujas fases de produção têm lugar na área geográfica delimitada (DGADR, 2018).

Em Portugal estão reconhecidas pela União Europeia seis denominações de origem protegida para azeite das quais três se encontram na região do Alentejo: Azeite de Moura DOP, Azeite do Alentejo Interior DOP, Azeite do Norte Alentejano DOP (DGADR, 2018).

Pelas suas características organolépticas, estabilidade, benefícios para a saúde, produção em áreas restritas do mundo e o consumo direto sem necessidade de purificação permitem que o azeite virgem usufrua de uma posição privilegiada no mercado. O seu preço elevado sempre foi um atrativo para a adulteração com mistura de óleos vegetais e óleos de bagaço de azeitona conduzindo a Food and Drug Administration a estabelecer um programa de regulação para controlo de mercado. Nas últimas décadas foram realizados vários trabalhos de investigação com o objetivo de travar as adulterações ao azeite e inseridos na legislação da Comunidade Europeia, nas normas do Codex Alimentarius e Conselho Oleícola Internacional (Boskou, 1998).

1.4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

A composição química do azeite varia de acordo com diferentes fatores, como a cultivar, o estado de maturação dos frutos, as condições agronómicas e características tecnológicas de produção (Firestone, 2005).

A composição química do azeite é complexa podendo dividir-se em duas frações, a *fração saponificável*, maioritária, que constitui cerca de 98,5 a 99% do peso total do azeite e a *fração*

insaponificável, minoritária, que constitui cerca de 1 a 1,5% do peso total do azeite (Gouveia, 1996). Consoante a categoria comercial do azeite a sua composição química difere, no entanto, as duas categorias comerciais mais valorizadas, virgem e virgem extra, têm composições químicas muito próximas.

1.4.2.1 – FRAÇÃO SAPONIFICÁVEL

A *fração saponificável*, insolúvel em água, responsável pelas características físicas do azeite, é constituída pelos componentes de concentração mais elevada, como os triacilgliceróis ou triglicéridos, os ácidos gordos e por alguns componentes menores, como os fosfolípidos, (Gouveia, 1995; Boskou, 1998).

Ácidos gordos: são formados por um grupo carboxílico ligado a uma cadeia hidrocarbonada, sendo a sua fórmula geral $C_nH_{2n+1}COOH$. O teor em ácidos gordos é um parâmetro que permite verificar a qualidade de um azeite. Os ácidos gordos podem ser classificados: de acordo com o número de carbonos que possuem, ou seja de cadeia curta (4-6 carbonos), de cadeia média (8-12 carbonos), de cadeia longa (14-18 carbonos) e de cadeia muito longa (mais de 20 carbonos); ou de acordo com o grau de saturação sendo saturados se a cadeia hidrocarbonada não tiver ligações duplas, monoinsaturados se a cadeia hidrocarbonada tiver uma ligação dupla, poliinsaturados se a cadeia hidrocarbonada tiver duas ou mais ligações duplas (Cunha, 2007).

A proporção dos diferentes ácidos gordos são diferentes nas gorduras dos alimentos, predominando no azeite os ácidos gordos monoinsaturados, normalmente designados por AGMI ou MUFA (Mataix & Carazo, 1995). O elevado teor de ácido oleico presente é a principal característica que distingue o azeite de outras gorduras de origem vegetal. Dos ácidos gordos poli-insaturados, designados por AGPI ou PUFA, o ácido linolénico e o ácido linoleico que, respetivamente, pertencem à categoria de ómega-3 e ómega-6, são considerados ácidos gordos essenciais (AGE) pela impossibilidade de serem sintetizados pelo nosso organismo. A relação entre os MUFA e PUFA é um parâmetro importante na avaliação da estabilidade de um azeite em que será tanto mais resistente à oxidação quanto maior for esta razão. A razão entre os AGE é útil para a caracterização de cultivares (Aguilera *et al.*, 2005).

Vários trabalhos de investigação realizados sobretudo por cromatografia de gases permitiram identificar os ácidos gordos presentes no azeite, tendo a Comunidade Europeia regulamentado o seu perfil no Regulamento CEE nº 2568/91 da Comissão de 11 de julho. O ácido oleico (C18:1) representa a maioria da composição total dos ácidos gordos presentes no azeite, entre 55 a 83%; o ácido palmítico (C16:0) varia entre 7,5 e 20%, o linoleico (C18:2) varia entre 3,5 e 21%, o esteárico (C18:0) varia entre 0,5 e 5%. Em menor quantidade fazem parte os ácidos gordos linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenóico (C20:1), margárico (C17:0), beénico (C22:0), lignocérico (C24:0) e mirístico (C14:0) (Sánchez *et al.*, 2001). A composição em ácidos gordos é um parâmetro importante em termos de qualidade. Assim o Conselho Oleícola Internacional (COI) e a União Europeia, emitiram vários documentos legais que impõem limites, nomeadamente para os ácidos gordos na posição *trans* para cada categoria de azeite (Anexo I). O azeite virgem extra, não pode exceder para o caso do C18:1t e para a soma dos isómeros C18:2t e C18:3t o valor de 0,05% (Regulamento (UE) nº61/2011; COI, 2006).

Vários estudos afirmam que na diferença de ácido oleico entre os diferentes azeites, a variedade representa 78,2% da variação, a diferença entre os anos representa 11,2% e a época de colheita apenas 1%. Os azeites provenientes das regiões mais meridionais e mais quentes do Mediterrâneo tendem a possuir um teor mais elevado em ácido linoleico do que os das regiões mais setentrionais (Uceda & Hermoso, 2008).

O corpo humano não consegue sintetizar quer o ácido gordo linoleico (18:2 n-6), quer o alfa-linolénico (18:3 n-3). Não são necessárias grandes quantidades destes ácidos gordos para prevenir manifestações de deficiência fornecendo o azeite uma quantidade baixa, mas adequada destes ácidos gordos. Estima-se a necessidade de ácido linoleico em 1-2% e linolénico em 0,2-0,6%, da ingestão total de energia, fornecido por 2-3 colheres de sopa de azeite/2700 kcal/dia (Fedeli e Testolin, 1991). Existem limites estabelecidos pelo Regulamento (EU) 61/2011 da Comissão de 24 de janeiro para os ácidos gordos existentes no azeite.

Triglicéridos: são substâncias com um alto teor energético pois aportam 9 kcal/g e desempenham uma função de armazenamento ou reservatório energético. Estão formados por uma molécula de glicerol esterificada com ácidos gordos e as suas propriedades biológicas são definidas pelo tipo de ácido gordo que possuem na sua composição (Primo, 1997), sendo os principais constituintes de todos os óleos e gorduras conhecidas. Como se pode observar na

Figura 1.10 um triacilglicerol é formado por um conjunto de três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (Sanchez *et al.* 2001).

Segundo Boskou os triglicéridos mais abundantes no azeite são a trioleína (OOO) entre 40 a 59%, a palmitodioleína (POO) entre 12 a 20%, a linoleodioleína (OOL) entre 12,5 a 20%, a palmitooleolinoleína (POL) entre 5,5 a 7% , onde os ácidos gordos estão identificados por L representa o ácido linoleico, O representa o ácido oleico e P representa o ácido palmítico (Boskou, 1996).

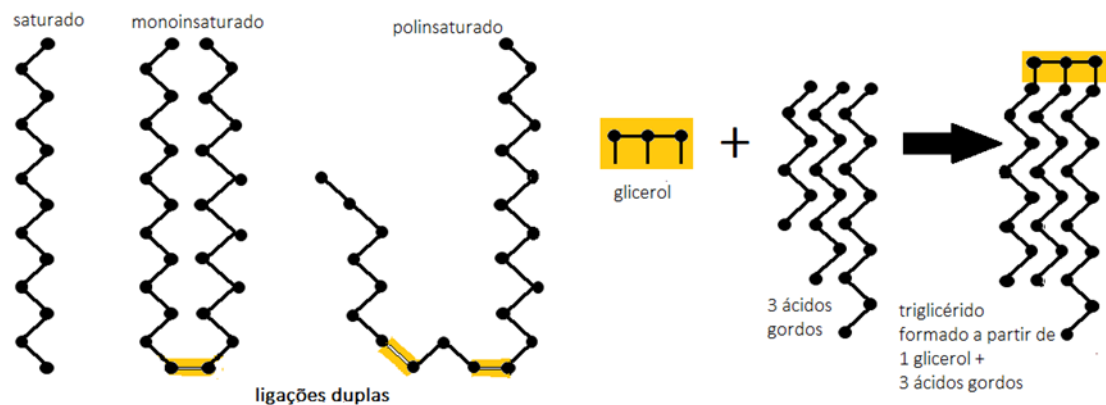


Figura 1.10 – Esquema representativo da formação de um triglicérido
(adaptado de Gouveia *et al.*, 2002)

Apesar de se encontrarem no azeite na forma natural pela biossíntese incompleta de triacilgliceróis, a presença de mono e diacilgliceróis pode também ser resultado das reações de hidrólise, rutura dos triglicéridos devido à alteração do azeite (Kiritsakis & Christie, 2000; Firestone, 2005). No azeite virgem a concentração de diacilgliceróis varia entre 1 e 2,8% e os monoacilgliceróis estão presentes em teores menores que 0,25% (Boskou, 1998). Os diglicéridos são mais abundantes que os monoglicéridos, uma vez que a concentração de diglicéridos num azeite virgem varia entre 1,0 e 2,8% e a quantidade de monoglicéridos é inferior a 0,25% (Boskou, 2006).

Cada ácido gordo apresenta propriedades características que condicionam tanto as qualidades físico-químicas da gordura como a sua atividade biológica. Deste modo, as gorduras com predomínio de ácidos gordos poli-insaturados são líquidas à temperatura ambiente devido

à presença de ligações duplas que conferem uma maior fluidez, pois ao baixar o ponto de fusão, tornam-no mais reativo, menos estável quimicamente, pois reagem mais facilmente com o oxigénio. Pelo contrário, as gorduras com 30-80% de ácidos gordos saturados são sólidas e constituem sebos e manteigas animais e algumas vegetais; por outro lado, as ligações simples configuram-se em posição *trans*, e as ligações duplas fazem-no em posição *cis*, a maioria das gorduras naturais. Isto origina uma conformação espacial de molécula diferente, o que implica importantes repercussões na atividade biológica das gorduras que as contêm (Primo, 1997).

O teor de ácidos gordos do azeite difere significativamente em função da variedade de azeitona. Outros fatores que podem modificar qualitativamente o teor de gordura no azeite são a latitude, condições edafoclimáticas e o grau de maturação na colheita da azeitona. Pelo contrário, os processos de refinação não alteram de forma significativa o teor em ácidos gordos (Boskou, 1998).

Fosfolípido: é o termo genérico que se refere qualquer lípido que contenha um grupo fosfato, incluindo os fosfoacilgliceróis. O conteúdo em fosfolípidos do azeite é baixo, entre 50 e 150 mg/kg de azeite (Uzzan, 1996). Já foram encontrados os seguintes compostos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidi-linositol e fosfatidilserina (Kiritsakis, 1992). O ácido oleico é o ácido gordo predominante nestes fosfolípidos (Boskou, 2006).

1.4.2.2 FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

A fração insaponificável, solúvel na água e sem valor energético, é cerca de 1 a 1,5% do peso total do azeite. Estes compostos garantem a estabilidade e as características organolépticas do azeite assim como sua atividade vitamínica, antioxidante e competidores na absorção intestinal de colesterol (Vidal *et al.*, 2006).

Apesar de estar em menor quantidade no azeite esta fração pode ser modificada por perdas de compostos durante as diversas fases que antecedem a comercialização do azeite. Estes componentes podem encontrar-se no azeite em maior ou menor quantidade variando em função da variedade, das condições climáticas e da localização geográfica do olival (Mataix & Carazo, 1995; Aparício, 2003). Algumas classes de constituintes menores apenas estão presentes no azeite virgem, sendo eliminadas durante o processo de refinação. É o caso, por exemplo, dos

fosfatídeos e dos compostos fenólicos. Para além disso, a refinação provoca ainda alterações quantitativas e qualitativas importantes noutras classes de compostos químicos (Boskou, 1998).

Hidrocarbonetos: podem ser de natureza terpénica, esteróica ou policíclica aromática e são responsáveis por entre 30 a 50% da fração insaponificável (Cunha, 2007). Os hidrocarbonetos terpénicos mais abundantes no azeite são o esqualeno, formado por 30 átomos de carbono, produto intermédio da biossíntese do colesterol e precursor dos triterpenos, responsável pelos efeitos benéficos para a saúde. O β -caroteno é outro hidrocarboneto tetrapernénico formado por 40 átomos de carbono e juntamente com a clorofila é responsável pela coloração verde-amarelada do azeite, a sua concentração é muito baixa e oscila, segundo os autores, entre 0,03 a 0,05 mg/100 g (Jiménez *et al.*, 2001).

Em pequenas quantidades (<0,5 mg/kg) surgem os hidrocarbonetos esteróicos em que a sua presença se deve a processos de refinação. O composto mais significativo é o estigmastadieno formado por processos de refinação a partir do β -sitosterol (Sánchez *et al.*, 2001). Em quantidades residuais (1 a 700 μ g/kg) encontram-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Foram identificados outros hidrocarbonetos presentes no azeite como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, de cadeia ramificada, entre outros, que contribuem para o sabor e aroma do azeite (Costa, 2012).

Esteróis: representam 20-30% do total da fração insaponificável (Fedeli & Jacini, 1971). O teor de esteróis permite identificar a origem e a pureza de um azeite. O conteúdo total no azeite é 189-265 mg/100 g, o qual se vai reduzindo por oxidação durante a elaboração e armazenamento do azeite e também no processo de refinação (Pasqualone & Calalano, 2000). A diminuição dos esteróis durante o armazenamento tem sido associada ao aumento do valor do índice de peróxidos (Sanchez *et al.*, 2001).

A partir da biossíntese do esqualeno obtêm-se compostos esteróicos que estão presentes no azeite como álcoois livres e ésteres de ácidos gordos. O principal esterol presente no azeite é o β -sitosterol e em menores quantidades o estigmasterol, colesterol, 24-metilenocolesterol, Δ 7-campesterol, Δ 5,23-estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, Δ 5,24-estigmastadienol, Δ 7-estigmastenol e Δ 7-avenasterol. Enquanto que as gorduras animais possuem quase exclusivamente colesterol, as gorduras vegetais têm como componente maioritário o β -sitosterol, além de outros esteróis, que dependerão da espécie vegetal de procedência (Cert *et*

al., 1997). O azeite é a única gordura que tem um elevado nível de β -Sitosterol, sendo relevante do ponto de vista da saúde pois contraria a absorção intestinal do colesterol (Viola & Wells, 1997).

Álcoois alifáticos diterpénicos e terpénicos: os álcoois alifáticos representam entre 20 e 26% da fração insaponificável, encontrando-se na forma livre e não esterificada (Reiter&Lorbeer, 2001). Os álcoois gordos são compostos lineares saturados com mais de 16 átomos de carbono e o seu teor não ultrapassa os 350 $\mu\text{g/g}$, sendo os mais abundantes no azeite: o docosanol (C22), tetracosanol (C24), hexacosanol (C26) e octacosanol (C28). Podem ainda encontrar-se álcoois com um número ímpar de carbonos e em quantidades vestigiais como o tricosanol, o pentacosanol e o heptacosanol (Sanchez, 2001). Também se encontram no azeite álcoois diterpénicos como é o caso do fitol e do geranilgeraniol que são diterpenóides acíclicos presentes na fração de álcoois alifáticos do azeite sob a forma livre e esterificada. Os principais álcoois triterpénicos presentes no azeite são o eritrodíol e o uvaol, livres ou esterificados com os ácidos gordos. O teor destes álcoois é usado como um parâmetro de pureza do azeite, sendo um valor muito elevado indicador de que o azeite foi obtido por solventes (Reiter&Lorbeer, 2001).

Ceras: são ésteres de álcoois gordos de cadeia longa, que podem conter até 58 átomos de carbono e o seu teor no azeite virgem não pode ultrapassar os 250 $\mu\text{g/g}$. As principais ceras detetadas em azeite têm números de carbono par, ou seja, são ésteres de ácido oleico ou palmítico. As ceras estão presentes na pele das azeitonas evitando a perda de água, são abundantes no óleo de bagaço de azeitona e no azeite lampante. A elevada acidez dos azeites implica um aumento da quantidade de ceras, uma vez que ocorre esterificação de álcoois alifáticos com ácidos gordos livres, este parâmetro pode ser usado como um critério para diferenciação dos vários tipos de azeite (Boskou, 2006).

Compostos fenólicos: também conhecidos por polifenóis, são substâncias químicas que possuem um anel aromático de benzeno, ligado a um ou mais grupos hidroxílicos incluindo derivados funcionais (ésteres, metil ésteres, glicósidos, entre outros) (Tsimidou, 1998; Pascoal *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2018a). A natureza dos polifenóis varia desde moléculas simples como os ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados, como os taninos e os flavonóides. Apresentam-se nas plantas em forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcar unidos aos grupos hidroxilos, ainda que em alguns casos podem produzir-se uniões diretas entre uma molécula de açúcar e um carbono aromático. Por isso a forma mais comum de os encontrar na natureza é em forma de glicósidos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos (Shahidi &

Nacz, 1995). A composição dos compostos fenólicos no azeite é bastante complexa e a sua concentração varia com o estado de maturação, as condições climáticas e de armazenamento utilizado durante a produção (Boskou, 2009).

Os compostos fenólicos podem agrupar-se em diferentes classes dependendo da sua estrutura química básica, podendo dividir-se em diferentes categorias tais como ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas, que contribuem para a avaliação organolética do azeite dando-lhes características únicas uma vez que estes compostos são específicos no azeite e não se encontram em qualquer outro óleo vegetal (Harbone, 1989).

Os ácidos fenólicos estão presentes em pequenas quantidades no azeite e podem dividir-se em dois tipos o benzóico e o cinâmico. A categoria de álcoois fenólicos é formada pelo hidroxitirosol e tirosol. Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra. Relativamente aos lignanos existem no azeite dois compostos, o pinoresinol e acetoxipinoresinol. A nível das flavonas, podem ser encontradas no azeite a apigenina ou luteolina (Servili *et al.*, 2004).

O azeite com elevado teor de compostos fenólicos é, de uma maneira geral, amargo e picante, por vezes excessivo e desagradável como é caso dos azeites resultantes de azeitonas demasiado verdes, conferindo-lhe uma elevada estabilidade e um sabor frutado forte (Visioli *et al.*, 2006).

Os polifenóis hidrossolúveis encontram-se maioritariamente presentes na polpa da azeitona, podendo encontrar-se no azeite em pequenas quantidades. O grupo de compostos fenólicos identificados no azeite virgem abrange um número elevado de substâncias como o ácido gálico, ácido cumárico, ácido vainílico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido elenólico, tirosol e hidroxitirosol. O azeite, em valores médios, contém 50-800 mg/kg de polifenóis totais expressos em forma de ácido cafeico. A sua concentração varia em função de diversos fatores como a variedade, o grau de maturação da azeitona e o sistema de elaboração, já que por se tratar de compostos hidrossolúveis podem perder-se com facilidade (Jiménez *et al.*, 2001).

Tocoferóis e tocotrienóis: constituem um grupo de substâncias que derivam do 2-metil-6-cromanol. Os tocoferóis contribuem para a estabilidade do azeite pois têm um papel importante como antioxidantes. Os tocotrienóis distinguem-se dos tocoferóis pela presença de três

insaturações na cadeia lateral, nomeadamente nas posições 2', 4' e 8', sendo por isso possível a ocorrência de 8 estereoisómeros, existindo 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, ambos designados por α , β , γ e δ . No azeite, o α - tocoferol ou vitamina E representa entre 90 e 95% do teor dos tocoferóis totais (150-300 ppm) sendo os restantes 5% constituído pelo β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol que possuem um marcado efeito antioxidante, diferindo entre si pelo número e posição de grupos metilo no anel aromático (Cunha, 2007).

Na elaboração do azeite virgem é muito importante manter a temperatura abaixo dos 35°C na etapa da termobatedura pois acima desta a vitamina E decompõe-se eliminando do azeite um dos seus antioxidantes mais importantes. A concentração de tocoferóis no azeite varia de maneira significativa em função de diversos fatores como a variedade da azeitona, o grau de maturação no momento da colheita e as condições e a duração do armazenamento. Por isso se reportam diversos valores no teor de tocoferóis no azeite virgem que variam entre 150-200 mg/kg (Jiménez *et al.*, 2001), ainda que alguns autores enumeram valores superiores até 240-430 mg/kg (Smith, 2000; Owen *et al.*, 2000).

Clorofilas e Carotenóides: a cor é um dos atributos de aparência mais importante dos alimentos por influenciar a escolha do consumidor (Avila & Silva, 1999). Apesar de não integrar os critérios de classificação para determinar a categoria comercial do azeite virgem, a perceção da cor pelos consumidores pode resultar na rejeição do produto, embora os restantes atributos sensoriais sejam considerados conformes (Moyano *et al.*, 2008). Cores diferentes das que normalmente o produto apresenta, especialmente aquelas associadas à deterioração da qualidade alimentar, induzem à rejeição do produto (Avila & Silva, 1999). A cor do azeite é um parâmetro importante na avaliação da sua qualidade (Voss, 1992; Gonçalves *et al.*, 2007; Mohammadi *et al.*, 2008), e os pigmentos presentes dependem da variedade e do grau de maturação do fruto, estando envolvidos em mecanismos de auto-oxidação e foto-oxidação (Reiter & Lorbeer, 2001).

Os pigmentos podem ser divididos em dois grupos, as clorofilas/feofitinas responsáveis pela coloração verde e os carotenóides responsáveis pela cor amarela do azeite (Escobar *et al.*, 2007). O estado de maturação é um dos fatores que influencia a quantidade destes pigmentos, verificando-se que quando os frutos se encontram no início da maturação a relação de clorofilas e carotenóides é maior (Alves, 2017).

No processo de extração do azeite, os fenómenos de separação implicados determinam a distribuição dos pigmentos da azeitona entre a fase sólida e as duas fases líquidas (azeite e água da vegetação). Dependendo da sua natureza, hidrofílica das antocianinas e lipofílica dos pigmentos do cloroplasto, os primeiros são retidos no bagaço e na água da vegetação, enquanto os últimos (clorofilas e carotenóides) são transportados na fase gordurosa (Ranalli et al., 2005).

O azeite contém clorofila “a” e “b” (pigmentos verdes) assim como feofitina “a” e “b” (pigmentos castanhos). Estes pigmentos são responsáveis pela cor do azeite. O azeite do início da campanha contém concentrações de clorofila “a” e “b” de 1 a 10 ppm e feofitinas “a” e “b” de 0,2 a 24 ppm (Herrera, 2011). O conteúdo de clorofila do azeite diminui ao longo do processo de maturação dos frutos. As clorofilas degradam-se com facilidade a feofitinas, sendo responsáveis pela cor esverdeada em azeites obtidos a partir de azeitonas no início da maturação, quando comparados com azeites obtidos de frutos mais maduros que apresentam uma coloração dourada (Herrera, 2011).

Das gorduras vegetais o azeite virgem é consumido contendo grandes quantidades de pigmentos de clorofila (Psomiadou & Tsimidou, 2001) apresentando uma elevada vulnerabilidade à exposição da luz em prateleira, podendo originar produtos de qualidade inferior. Os pigmentos de clorofila atuam como fotosensibilizadores devido à capacidade de transferir energia da luz para o oxigénio tripleto, produzindo assim oxigénio singleto, que então reage com os ácidos gordos insaturados. Devido à presença destes pigmentos o azeite é muito sensível à radiação compreendida entre 320 e 700 nm por absorver a luz neste espectro, seja na presença ou ausência de antioxidantes (Vazquez-Roncero, 1980). As clorofilas e feofitinas têm um efeito pro-oxidante sobre os lípidos em presença da luz, pois induzem a fotoxidação. Na ausência de luz atuam como antioxidantes, pelo que se torna imprescindível que o azeite esteja protegido durante o armazenamento. Quanto mais elevado forem os níveis de clorofila no azeite, maior é a sua atividade catalisadora (Rahmani, 1989).

As clorofilas são responsáveis pela cor esverdeada do azeite nomeadamente a clorofila ‘a’ e ‘b’ e feofitinas ‘a’ e ‘b’. Os carotenóides (luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina), quimicamente chamados de terpenos são derivados do ácido mevalónico e responsáveis pela cor amarelada dos azeites. A quantidade destes compostos é influenciada pelo estado de maturação, zona de produção, sistema de extração e condições de armazenamento do azeite. Apesar das clorofilas e carotenóides serem considerados como um índice de qualidade, ainda não existe

nenhum método padronizado com critérios de classificação para o azeite (Boskou *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2001).

Compostos voláteis e aromáticos: a formação de compostos aromáticos ocorre pelo contacto das gotas de azeite com os cloroplastos sendo os componentes voláteis arrastados pelos lípidos. Foram identificados mais de 100 componentes, entre os quais hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis e seus derivados, terpenos oxigenados e derivados do furano. A concentração de compostos voláteis no azeite virgem costuma ser inferior a 1 ppm e varia entre as diferentes variedades de azeitona existindo pequenas diferenças entre as mesmas variedades cultivadas em regiões diferentes (Luna *et al.*, 2005). Os aldeídos são compostos aromáticos maioritários no azeite que transmitem a qualidade aromática tornando-o um produto especial e apreciado (Kiritsakis, 1998).

A formação de compostos voláteis resulta da destruição celular da azeitona, desencadeando-se um processo enzimático onde se produzem reações de hidrólise e de oxidação (Olias *et al.*, 1993). Entre os compostos identificados no aroma do azeite virgem existe uma quantidade apreciável que ao serem inalados por separado podem associar-se a determinadas notas olfativas (Aparício *et al.*, 1996). Os compostos aromáticos como o hexanal traduz uma nota olfativa a frutado verde, maçã; o *trans*-2-hexenal traduz um aroma a amêndoa amarga; o 1-hexanol traduz um aroma frutado, aromático e suave; o 3-metil-butanol pelo contrário traduz um aroma não desejável. Quando um azeite virgem é sujeito a um processo de termo-oxidação, inicialmente a maioria dos compostos voláteis responsáveis pelas características sensoriais agradáveis do azeite virgem desaparecem, formando-se compostos desagradáveis, sendo provável que os aldeídos formados sejam os principais responsáveis. A presença de nonanal, não detetado no azeite virgem, poderia ser utilizado para detetar o início da oxidação (Morales *et al.*, 1997). Foram detetados compostos carbonilos saturados, tais como o pentanal, hexanal, octanal e nonanal como os principais compostos formados no azeite oxidado armazenado durante 6,8,16 dias a 160°C (Morales *et al.*, 1997).

Barrio *et al.* (1981) descobriram que quando se incrementa uma percentagem de octano no azeite a sua qualidade sensorial diminui. Solinas *et al.* (1987) estudou a relação entre a deteção do ranço e os conteúdos de 2-pentenal, 2-heptenal, 2-octenal, octanal e nonanal. O 2-pentenal e 2-heptenal foram os principais indicadores de ranço, com limites de 0,5 e 1,5 ppm respetivamente (Zafra *et al.*, 2006; Kalua *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 1997).

1.4.3 O AZEITE COMO PRODUTO NUTRACÊUTICO

Desde há vários séculos que os produtos derivados da oliveira têm sido utilizados pelas suas importantes propriedades nutricionais e terapêuticas. Já Hipócrates, no remoto ano de 400 a.c., aconselhava o sumo de azeitona fresca para tratar doenças mentais e compressas de azeitonas maceradas para curar úlceras. O médico romano de origem grega Dioscórides, entre os anos de 50 e 70, escreveu sobre estes temas na "*De Materia Medica*", obra de referência sob a forma de manuscritos ilustrados sobre ervas e medicamentos que se podem obter, até Galeno, por volta do ano 170 redigir um livro de 150 páginas de receitas medievais em que o azeite foi considerado um ingrediente (Lercker *et al.*, 2010).

Tradicionalmente os produtos provenientes da oliveira têm sido um recurso para tratar infeções cutâneas graças à sua atividade emoliente e cicatrizante; para curar constipados, herpes ou infeções do trato digestivo e urinário, graças às suas propriedades antimicrobianas; e também para o tratamento de úlceras, dores de estômago e fígado, graças às suas propriedades anti-inflamatórias. Por outro lado, a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória faz com que seja uma excelente ajuda para a prevenção e o tratamento de doenças crónicas, em que os processos oxidativos e inflamatórios constituem um fator importante no seu desenvolvimento, como são as doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurodegenerativas. Os efeitos benéficos atribuídos ao azeite virgem extra estão representados na Figura 1.11 (Sánchez-Rodríguez & Mesa, 2018).

A primeira investigação sobre as propriedades nutraceuticas do azeite foi realizada pelo biólogo e fisiologista americano Ancel Keys, que em 1970 apresenta um estudo comparativo de regimes alimentares em sete países (Estados Unidos, Itália, Holanda, Grécia, Finlândia, Japão e ex-Jugoslávia), o "Seven Countries Study" que fornece a mais forte evidência de que as dietas ricas em ácidos gordos saturados aumentam o risco de doenças coronárias. Deste estudo concluiu-se que os habitantes da ilha de Creta tinham a menor taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares devido ao consumo de azeite na confeção e no tempero dos alimentos em detrimento de outros países como a Finlândia, onde a dieta diária incluía gorduras saturadas, como a manteiga e a banha (Dominguez & Barbagallo, 2007).

A partir desse momento, a comunidade científica realizou inúmeros estudos sobre a nutrição da população da bacia do Mediterrâneo, confirmando as teorias de Keys, tanto que,

desde 2010, a dieta mediterrânica é considerada Património da Humanidade pela UNESCO e recomenda-se o uso mundial de azeite virgem extra para prevenir o envelhecimento e preservar o organismo das doenças cardiovasculares. Os benefícios de saúde da dieta mediterrânica e o seu efeito protetor de doenças crónicas têm sido fundamentados pela comunidade científica(UNESCO,2018).

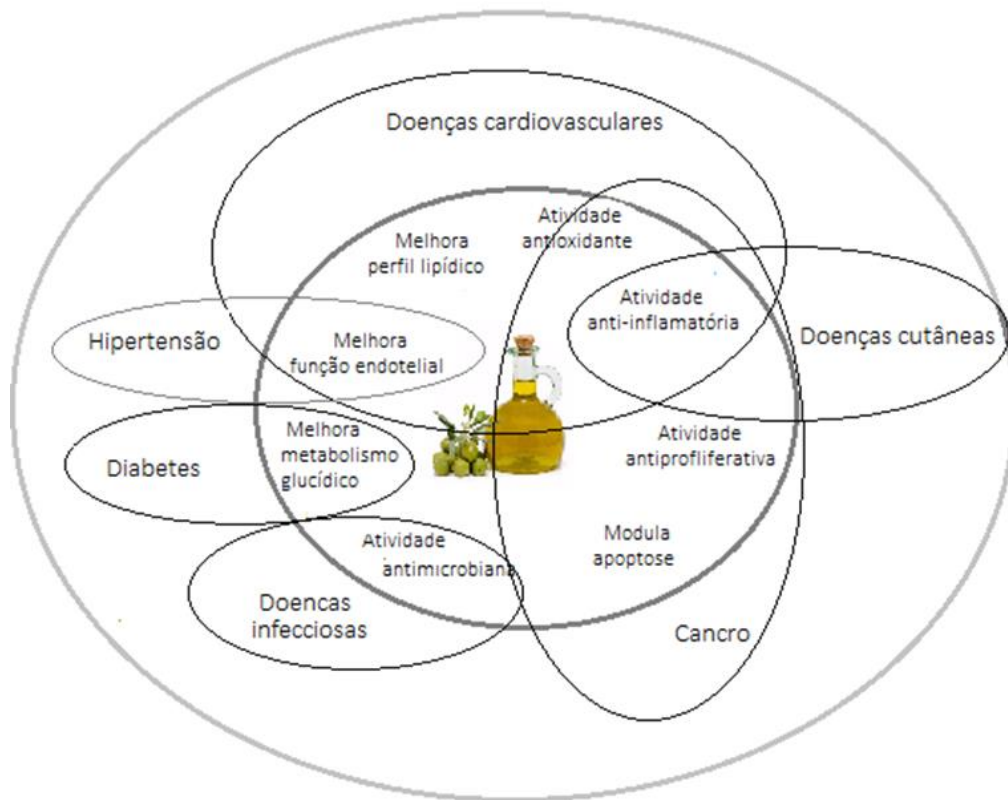


Figura 1.11 - Principais mecanismos de ação para o azeite virgem extra e seus componentes minoritários na prevenção de doenças (adaptado de Sánchez-Rodríguez & Mesa, 2018).

A pirâmide tradicional da dieta mediterrânica evoluiu, adaptando-se às novas formas de vida. Da iniciativa da Fundação Dieta Mediterrânica e com a colaboração de entidades internacionais e especialistas em nutrição, antropologia, sociologia e agricultura chegou-se a um consenso quanto à adaptação de um novo design mais rico, com a incorporação de elementos qualitativos. A nova pirâmide segue o padrão anterior: na base, alimentos que deverão sustentar a dieta, e nos níveis superiores, alimentos a serem consumidos em quantidades mais moderadas. Além disso, os aspetos sociais e culturais característicos do modo de vida mediterrânico estão também incorporados. Esta nova pirâmide inclui todos os grupos de alimentos, definindo uma dieta saudável pelas suas proporções e frequências (UNESCO,2018).

Neste contexto de alimentação e saúde, o azeite virgem tem vindo a adquirir um papel cada vez mais importante, fortemente impulsionado nas últimas décadas pela sua posição predominante como fonte de gordura na Dieta Mediterrânica, reconhecida como fator de longevidade e redução do risco de morbilidade e mortalidade. Contudo, apesar dos benefícios de consumo de azeite serem reconhecidos desde a antiguidade, a prova científica dos mesmos tem evoluído lentamente ao longo dos tempos, principalmente porque os benefícios do seu consumo surgem num contexto de uma dieta equilibrada e de um estilo de vida saudável e não do seu consumo isolado (Casal *et al.*, 2017).

O azeite virgem e virgem extra está posicionado no centro da pirâmide sendo um dos elementos básicos das três refeições diárias, como fonte principal de lípidos na dieta devido à sua alta qualidade nutricional (Figura 1.12). A sua composição confere uma elevada resistência às temperaturas de confeção e deve ser usado para cozinhar como também para fins terapêuticos. Atualmente defende-se que os efeitos benéficos da dieta mediterrânica são atribuíveis em grande medida ao consumo de azeite, em que se recomenda um consumo diário entre 25 e 50 ml de azeite virgem extra para prevenir o envelhecimento e preservar o organismo contra doenças cardiovasculares (CIHEAM,2018).

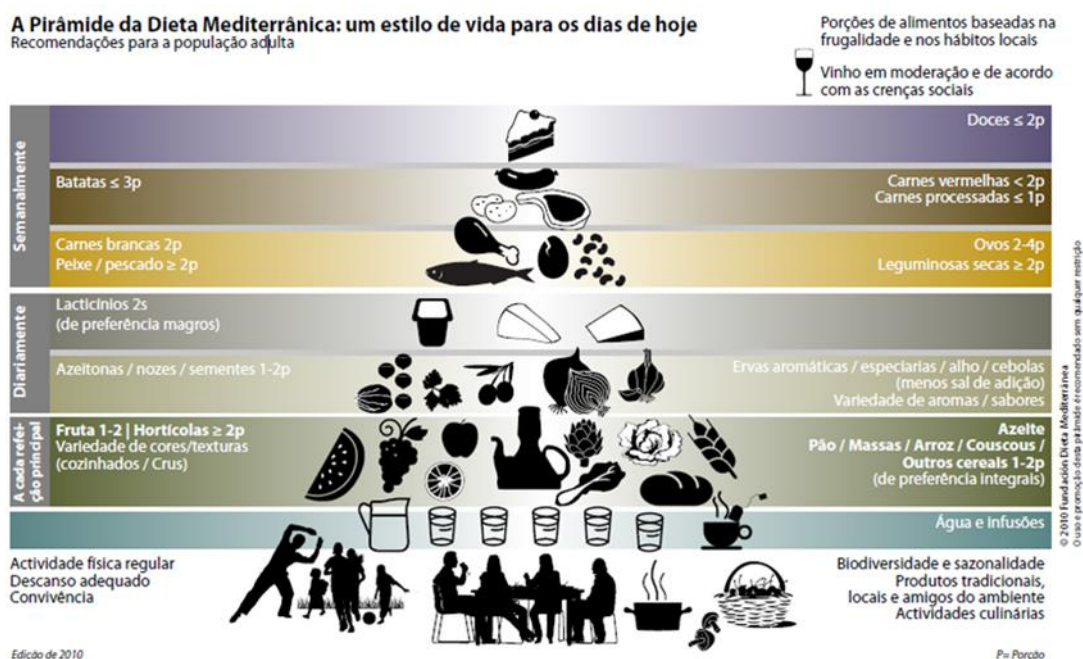


Figura 1.12 – Pirâmide alimentar refletindo a Dieta Tradicional Mediterrânica (CIHEAM,2018)

A riqueza do azeite em ácidos gordos monoinsaturados, nomeadamente em ácido oleico (55 a 83%), foi durante muito tempo tida como o fator principal associado à sua importância

nutricional do azeite (Estruch *et al.*, 2013). Diversos trabalhos científicos têm comprovado que a substituição na dieta de gorduras saturadas por azeite reduz os níveis de colesterol total e de colesterol-LDL, também chamado “mau” colesterol, que são dois fatores importantes no risco cardiovascular. Nos EUA, desde 2004 é possível a indicação de que a ingestão de duas colheres de sopa de azeite por dia, em substituição de outra gordura saturada e sem aumentar o aporte calórico diário, pode contribuir para a redução do risco de doença coronária pela sua riqueza em lípidos monoinsaturados (Casal *et al.*, 2017).

Outros óleos vegetais, como os de girassol, soja e colza, que também contêm altas concentrações de ácido oleico, não exibem os mesmos benefícios para a saúde que o azeite virgem extra. Além do ácido oleico, o azeite virgem extra contém uma fração fenólica menor, porém significativa, que outros óleos vegetais carecem e essa fração gerou muito interesse em relação às suas propriedades promotoras da saúde (Ruíz-Gutiérrez, 1996).

Análises mais detalhadas levaram à descoberta de compostos denominados secoiridóides, que estão presentes exclusivamente em plantas pertencentes à família Olearaceae, que inclui a espécie *Olea europaea* L. Estes compostos são ésteres do ácido elenólico que podem ser encontrados na forma glicosilada como a oleuropeína, a dimetiloleuropeína e o ligstosídeo que se ligam a um anel de β -glucopiranosose; e na forma não glicosilada chamada aglicona, como a oleuropeína aglicona e o lignósido aglicona ou com a parte acila na forma dialdeído após a abertura do anel de ácido listélico, como o oleocantal e a oleaceína (Figura 1.13) (Servili *et al.*, 2014).

Vários estudos indicam que as atividades terapêuticas do azeite se devem aos compostos fenólicos (hidroxitirosol, oleuropeína, oleocantal e oleaceína) (Villani, 2015; Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018) pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiproliferativas.

O hidroxitirosol é o composto mais estudado pelo seu forte potencial antioxidante e anti-inflamatório. Este composto pode controlar o estado redox intracelular, regulando os danos oxidativos induzido nas células e exercer uma ação anti-inflamatória que contribui na prevenção de acidentes cardiovasculares, diabetes, cancro e doenças neurodegenerativas, cuja etiologia e progressão está relacionada com estes processos. Além disso é absorvido rapidamente e não se acumula no organismo, pelo que não ocasiona efeitos tóxicos (Robles-Almazan *et al.*, 2018).

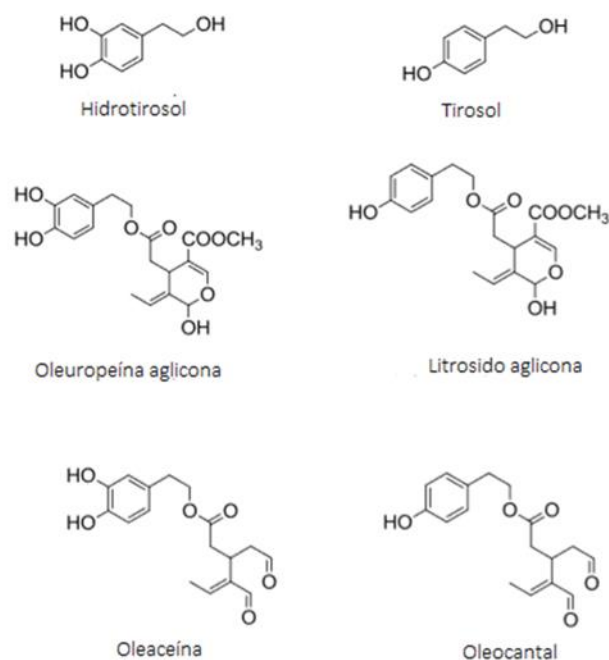


Figura 1.13 - Principais compostos fenólicos do azeite (estrutura química dos principais álcoois fenólicos e seus derivados secoiridóides presentes no azeite) (Bassi, 2014)

A oleuropeína, componente maioritário na fração insaponificável do azeite e das folhas de oliveira, é responsável pelo sabor amargo do azeite virgem extra, sendo importante pela sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Robles-Almazan *et al.*, 2018). Por outro lado, os estudos com ácido oleanólico e outros derivados triterpénicos demonstraram a sua capacidade para restaurar os transtornos vasculares associados a fatores de risco cardiovascular, como a hipertensão, a obesidade, a diabetes e a arterioesclerose, mostrando-os como uma estratégia terapêutica prometedora para prevenir a disfunção vascular (Rodríguez-Rodríguez, 2015), assim como as suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (Sánchez-Quésada *et al.*, 2013).

Um composto fenólico do azeite que tem particular interesse devido às suas propriedades é a forma dialdehídica da aglicona do descarboximetilgustrosídeo e foi relatado pela primeira vez no azeite virgem extra em 1993 por Montedoro (Montedoro & Servili, 1993). Uma década depois da sua descoberta, Andrews e seus colaboradores relataram que este composto era responsável pela irritação da garganta e pelo picante provocado por alguns azeites, confirmado mais tarde por Beauchamp *et al.* (2005) sendo denominado Oleocantal (“óleo” para azeitona, “canth” para picante e “al” para aldeído). Estudos recentes com o oleocantal demonstraram o seu grande potencial anti-inflamatório, anticancerígeno e neuroprotector (Lucas *et al.*, 2011).

A forma dialdehídica da aglicona da oleuropeína, conhecida como oleaceína, apresentou propriedades semelhantes ao oleocantal, no entanto apresenta propriedades protetoras face ao cancro da mama e uma potente atividade anti-inflamatória superior ao do hidroxitirosol. O estudo de Czerwinska e seus colaboradores comprova a atividade da oleaceína como um dos constituintes mais abundantes na fração fenólica do azeite virgem extra contra as incidências cardiovasculares, podendo desempenhar um papel na prevenção primária e secundária das doenças das artérias coronárias, protegendo a parede arterial contra as alterações pró-aterogénicas induzidas pelos neutrófilos (Czerwinska *et al.*, 2014).

O oleocantal e a oleaceína são compostos fenólicos do azeite e derivam respetivamente do hidroxitirosol e do tirosol pertencente à classe dos fenil-álcoois, sendo moléculas importantes do ponto de vista nutracêutico. Em particular, a oleaceína e a oleuropeína aglicona são derivados do hidroxitirosol, enquanto o oleocantal e o lignósido aglicona são derivados do tirosol. As concentrações dos fenil-álcoois são geralmente baixas no azeite recém-extraído e tendem a diminuir durante o armazenamento graças à hidrólise realizada pela betaglucosidase (contida no mesocarpo do fruto) de derivados esterificados (secoiridóides) que os contêm na estrutura ou oleuropeína e ligstrosídeo para dar os correspondentes derivados aglicónicos oleaceína, oleocantal, oleuropeína, aglicona e aglicona ligstrosídica. (Scalzo & Scarpati, 1993).

Geralmente a sensação de irritação causada por substâncias é percebida em toda a área da cavidade oral, enquanto que a sensação de irritação causada pelo azeite virgem extra é sentida apenas na zona do trato orofaríngeo (Figura 1.14). A intensidade dessa sensação varia de indivíduo para indivíduo e passa de um simples “arranhar” a uma intensa irritação, produzindo a típica “tosse” nas pessoas mais sensíveis. Estudos recentes identificaram um recetor de canal específico para o oleocantal denominado TRPA1 (canal catiónico de potencial receptor de transientes, subfamília A, membro 1) e a variabilidade interindividual dessa sensação pode estar associada a uma expressão desse recetor no trato orofaríngeo (Cicerale *et al.*, 2012).

Beauchamp e colaboradores isolaram e identificaram o oleocantal como um anti-inflamatório não esteróide presente na forma natural no azeite virgem extra, caracterizado por uma atividade inibidora da cicloxigenase (COX-1 e COX-2) semelhante à atividade do ibuprofeno no seu mecanismo de ação (Beauchamp *et al.*, 2005). Recentemente, investigadores do Centro para a Investigação da Atividade Física e Nutrição da Austrália, procederam a uma revisão dos

diversos efeitos benéficos que o oleocantal presente no azeite virgem extra pode ter sobre os processos patológicos relacionados com a inflamação crónica, entre os quais se encontram alguns tipos específicos de cancro, as doenças degenerativas das articulações e neurodegenerativas como o Parkinson e Alzheimer (Parkinson & Keast, 2014).

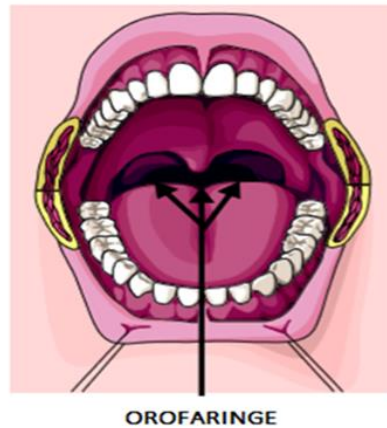


Figura 1.14 - A sensação de irritação do oleocantal ocorre apenas na região da orofaringe da cavidade oral (área sombreada a preto) (Cicerale *et al.*, 2012).

Os investigadores colocam a hipótese de que o consumo regular de oleocantal poderia ser responsável pela menor incidência de doenças associadas à dieta mediterrânica. Se um indivíduo consumir 50 g de azeite virgem extra diariamente contendo cerca de 200 µg/ml de oleocantal, considerando uma absorção de 60-90%, então a ingestão total de oleocantal é de 9 mg por dia. Essa dose é relativamente baixa e corresponde a 10% da dose recomendada de ibuprofeno para aliviar a dor num adulto (Beauchamp *et al.*, 2005) e também é conhecida como uma baixa dose de aspirina, por exemplo, outro inibidor de COX que confere benefícios à saúde cardiovascular.

No azeite os principais compostos fenólicos com propriedades benéficas incluem o hidroxitirosol e os seus derivados, como o tirosol ou a oleuropeína. As provas científicas relativas a estes compostos no azeite são de tal forma já consistentes, que, em 2011, foi autorizada uma alegação de saúde específica para os “Polifenóis do azeite”. De facto, foi demonstrada uma relação direta e consistente entre a “dose” ingerida de polifenóis do azeite e a redução da oxidação dos lípidos sanguíneos, nomeadamente do colesterol-LDL. Relativamente a outras atividades biológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória do oleocantal, aparentemente semelhante ao ibuprofeno, não foi ainda encontrada evidência científica suficiente para validar novas alegações (Casal *et al.*, 2017).

Neste sentido, foi introduzido no Regulamento (CE) 432/2012 de 16 de maio a utilização de uma alegação de saúde para os compostos fenólicos do azeite: “os compostos fenólicos do azeite contribuem para a proteção dos lípidos sanguíneos do stress oxidativo”. Contudo, para que esta alegação seja permitida, o azeite tem de conter pelo menos 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados em 20 g de azeite e o consumidor deve perceber claramente de que o efeito benéfico é obtido com uma dose diária de 20 g de azeite, ou seja, o equivalente a cerca de duas colheres de sopa.

Pela importância deste tema nas várias comunidades científicas houve necessidade de criar uma equipa multidisciplinar internacional, distinta, constituída por membros com diversos interesses no campo da pesquisa, gastronomia e media. A “International Society of Oleocanthal (OIS), Health-Olive -Food” foi criada em maio de 2015 por científicos, nutricionistas, médicos, dietistas, cozinheiros e profissionais do mundo da comunicação. A sua principal missão é facilitar a investigação sobre o oleocantal, tal como as técnicas analíticas e informação sobre outros componentes tais como a oleaceína e derivados fenólicos, incentivando a pesquisa e divulgação dos resultados na comunidade científica, tornando os potenciais promotores de saúde acessíveis ao público em geral. Uma adequada utilização de azeite virgem extra com elevados teores fenólicos na dieta diária pode equiparar-se a um alimento funcional. Os membros fundadores provêm de Espanha, Grécia e Estados Unidos, sendo expectável a sua expansão pela manifestação de intenção de adesão de especialistas de Itália, Austrália, França, Tunísia, Croácia e Portugal. (Mercacei,2018).

Uma das atividades anuais desenvolvidas desde 2016 foi o concurso a nível internacional do “Azeite Virgem Extra mais saudável do mundo” reservado a azeites virgem extra avaliados em três categorias diferentes: pela sua composição em gordura saturada e insaturada (entre 12,5% e 18% para as saturadas e entre 82% e 87,5% para as insaturadas), pelo seu teor em fenóis e pelo seu teor em oleocantal, fenol responsável pela particular característica do picante e por estar demonstrado cientificamente que intervém nos processos terapêuticos contra o cancro, sendo também anti-inflamatório, antipirético e analgésico intervindo na coagulação do sangue e na regulação das prostanglandinas (Sociedad Andaluza del Oleocanthal, 2018).

1.5 OBJETIVOS

Na região Alentejo podem encontrar-se variedades autóctones de azeitona que apresentam características bem diferenciadas das restantes variedades implantadas atualmente em Portugal. Com propriedades benéficas para a saúde e elevada qualidade nutricional, o azeite virgem extra é uma gordura vegetal nobre, graças à sua composição química única. Produtos inovadores, de elevada qualidade nutricional, com benefícios para a saúde e de conservação alargada, são uma mais-valia no sector agro-alimentar. A revisão bibliográfica demonstra que até à data são escassos os trabalhos que avaliam a variabilidade na composição fenólica nos azeites provenientes de variedades de azeitona portuguesas. Os recentes estudos sobre o elevado poder anti-inflamatório, antipirético e analgésico do oleocantal e da oleaceína, com efeitos inerentes à saúde sugerem a possibilidade de classificar os azeites obtidos de diferentes variedades em função do seu conteúdo.

Com este trabalho pretende-se caracterizar os azeites em estudo obtidos de diferentes variedades nacionais e estrangeiras, com base nos valores dos parâmetros de qualidade regulamentados oficialmente. Uma vez conhecidos estes parâmetros e a dependência varietal dos mesmos, assim como a variação com a maturação do fruto, existem outros parâmetros de qualidade que não estão incluídos nas normas mas que são utilizados igualmente. A influência dos compostos minoritários na capacidade antioxidante do azeite virgem extra é importante para avaliar a proteção à oxidação e deterioração do azeite, pelo que se analisam o conteúdo em compostos fenólicos, em flavonóides, a atividade antioxidante, o conteúdo em pigmentos (clorofila e carotenóides), a cor e o teor em oleocantal (*p*-HPEA-EDA) e oleaceína (3,4-DHPEA-EDA).

Estes parâmetros permitem estabelecer uma qualidade potencial que oriente e sirva como valor referencial os produtores da região. A qualidade do azeite é um elemento diferenciador, permitindo a prática de melhores preços num mercado cada vez mais competitivo.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

O estudo decorreu durante a campanha de azeitona de 2017/2018. Nos meses de novembro e dezembro foram recolhidos cerca de 30 kg de azeitona de cada cultivar num total de sete cultivares: Arbequina, Blanqueta, Cordovil, Cobrançosa, Galega, Picual e Verdeal, provenientes de diferentes explorações olivícolas localizadas na região Alentejo. Na Figura 2.1 apresenta-se um mapa com a localização geográfica dos pontos de recolha das amostras.



Figura 2.1 – Localização geográfica dos pontos de recolha de azeitona
(1 – Estremoz, 2 – Moura, 3 – Beja)

Os olivais selecionados seguem o modo de produção integrado sob sistema intensivo, em regime de regadio e sequeiro, conforme a Tabela 2.1. As técnicas culturais praticadas nestas explorações garantem um adequado controlo fitossanitário, de forma a assegurar frutos de qualidade.

Tabela 2.1– Caracterização dos olivais onde foram recolhidas as amostras

Cultivar	Concelho	Freguesia	Regime	Idade (anos)	Compasso de plantação (m ²)
Arbequina	Beja	Sta.Clara Louredo	regadio	15	7 x 5
Blanqueta	Estremoz	Veiros	regadio	15	7 x 8
Cobrançosa	Moura	União Freguesias	regadio	6	7 x 8
Cordovil	Moura	União Freguesias	regadio	6	7 x 8
Galega	Moura	União Freguesias	regadio	5	8 x 5
Picual	Moura	Amareleja	regadio	13	7 x 7
Verdeal	Moura	União Freguesias	sequeiro	50	7 x 6

Os frutos foram recolhidos na época normal de colheita (Tabela 2.2) e transportados em caixas plásticas perfuradas. Estabeleceu-se um peso por caixa de 15 kg com o objetivo de

preservar as melhores condições de conservação e transporte, promover o arejamento e evitar o esmagamento entre os frutos.

Tabela 2.2 - Codificação das amostras de azeite e data da colheita da azeitona

Amostra	Cultivar	Data da colheita
Abq	Arbequina	21.11.2017
Blq	Blanqueta	06.11.2017
Cbr	Cobrançosa	26.11.2017
Cdv	Cordovil	26.11.2017
Glg	Galega	08.11.2017
Pcl	Picual	21.11.2017
Vrd	Verdeal	19.12.2017

Através da reprodução do processo industrial, à escala de laboratório, pelo método Abencor criado por Levi de León para determinação do rendimento industrial da azeitona foi possível obter o azeite das amostras. Este método segue as mesmas fases do sistema de extração de azeite: moenda da azeitona, batimento da massa, centrifugação e decantação (Frias Ruíz *et al.*, 1999), como se pode verificar pelo equipamentos utilizados na Figura 2.2. A extração do azeite de todas as amostras de azeitona recolhidas foi efetuada no mesmo equipamento pertencente ao laboratório de análises de um lagar particular, no próprio dia em que as azeitonas foram colhidas, como forma de evitar processos de degradação da matéria prima.



Figura 2.2- Equipamento Abencor (1 - moinho, 2 – batedeira, 3 – centrífuga)

Após extração e decantação procedeu-se à filtração do azeite para remoção de pequenas partículas. Posteriormente as amostras de azeite foram conservadas em frascos de plástico de 250 mL sob condições de refrigeração (4°C) e transportadas até às instalações do Departamento

de Ciências e Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), mantendo-se nestas condições até a sua análise.

2.2 MÉTODOS UTILIZADOS

Neste capítulo são descritas as análises efetuadas às amostras de azeitona e de azeite virgem, baseadas em normas, regulamentos europeus ou métodos internos.

2.2.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO

Para a determinação do Índice de Maturação das azeitonas foi adoptado o método estabelecido pela Estação de Olivicultura e Elaiotecnia de Jaén, que atribui um índice em função da cor da pele e da polpa da azeitona (Hermoso *et al.*,1998).

Para as diferentes cultivares colheu-se uma amostra de azeitonas de aproximadamente 2 kg, dos quatro quadrantes da árvore e à altura do operador. Homogeneizou-se a amostra e recolheram-se 100 frutos aleatoriamente que se classificaram de acordo com uma escala de categorias com valores compreendidos entre 0 a 7 (Tabela 2.3). Esta análise foi realizada no laboratório do lagar da Olidal (Estremoz).

Tabela 2.3 – Escala para obtenção do Índice de Maturação (Hermoso *et al.*,1998)

Cor da azeitona/Categoria	Valor
Pele verde intenso	0
Pele verde amarelada	1
Pele verde com manchas arroxeadas em menos de 50% do fruto	2
Pele roxa em mais de 50% do fruto	3
Pele negra e polpa branca	4
Pele negra e polpa roxa em menos de 50%	5
Pele negra e polpa roxa sem chegar ao caroço	6
Pele negra e polpa totalmente roxa até ao caroço	7

O Índice de Maturação é determinado pelo somatório dos produtos do número de azeitonas de cada categoria multiplicado pelo respetivo valor numérico, de acordo com a tabela 2.3, dividido por 100, obtendo-se valores entre 0 (todos os frutos com pele verde intensa) e 7 (todos os frutos com a pele negra e polpa totalmente roxa até ao caroço). O método estipula que o azeite se encontra totalmente formado quando o Índice de Maturação atinge valores de 3,5;

estando a maioria dos frutos nas categorias de valor 2 e 3, alguns já com pele negra (categoria de valor 4 ou superior) e poucos com a pele verde amarelada (categoria de valor 1) (Hermoso *et al.*, 1991).

Esta classificação efetuou-se em todas as amostras, imediatamente após a recolha. Para as classificações nas categorias de valor 4, 5, 6 e 7 foi necessário cortar longitudinalmente a azeitona.

2.2.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO, HUMIDADE, GORDURA TOTAL E NA MATÉRIA SECA

A água e o azeite são os constituintes maioritários da azeitona madura. A quantidade de água contida no fruto é medida pela *humidade* (H), expressa em percentagem de água referente ao peso total do fruto. A quantidade de azeite é medida pela *gordura total* (GT, expressa em percentagem de gordura referente ao peso total do fruto. A *gordura na matéria seca* (GMS) é um parâmetro muito mais estável por não ser influenciado pela humidade contida na azeitona, calculada pela equação 2.1:

$$\text{Gordura na matéria seca (\%)} = \frac{\text{Gordura total (\%)}}{100 - \text{Humidade (\%)}} \quad \text{Equação 2.1}$$

O *rendimento industrial*, em percentagem, obtém-se a partir da seguinte equação 2.2:

$$\text{Quantidade de azeite na amostra (\%)} = \frac{\text{volume de azeite obtido (mL)} \times 0.916}{\text{quantidade de pasta obtida (g)}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Através do equipamento Foss OliviaTM, que utiliza a tecnologia de luz infravermelha próxima (NIR) (Figura 2.3), foi possível determinar a gordura total, humidade e gordura na matéria seca para cada uma das amostras de azeitona, em triplicado. Após trituração da amostra depositaram-se 75 gramas de massa de azeitona no recipiente do equipamento para leitura de 30 segundos no equipamento, calibrado para cada tipo de azeitona. A técnica NIR, de infravermelho próximo, tem sido muito utilizada na indústria do azeite para a determinação de certos parâmetros analíticos como a quantidade em gordura, a humidade, a acidez em amostras de azeitonas, azeite e bagaço (Sato, 1994; Garcia *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 2000; Bertrán *et al.*, 2001; Muik *et al.*, 2004).



Figura 2.3 - Equipamento Foss Olivia™

A *extratabilidade* do processo calculou-se como a percentagem de azeite extraído em relação ao total obtido. Este parâmetro indica o tipo de pasta de azeitona com que se vai trabalhar e a sua capacidade de libertar o azeite que contém (Muñoz-Aranda & Alba, 1980).

$$\text{Grau de extratabilidade (\%)} = \frac{\text{Rendimento industrial (Abencor)\%}}{\text{GT (\%)}} \times 100 \quad \text{Equação 2.3}$$

2.2.3 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS LIVRES

A determinação dos ácidos gordos livres foi efetuada de acordo com o Regulamento CE 2568/91, anexo II alterado pelo Regulamento (CE) nº702/2007 da Comissão de 21 de junho e Regulamento de Execução (UE) 2016/1227 da Comissão de 27 de julho, no Laboratório de Análises Químicas Professor Santos Oliveira do Departamento de Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (LAQ-FCT UNL).

Pesaram-se cerca de 10 g de amostra de azeite na balança Explorer Pro EP213 que se dissolveram em 50 mL de uma mistura de solventes 1:1 em volume, éter e etanol a 95%, previamente neutralizada. A titulação dos ácidos gordos livres presentes efetuou-se, com agitação, com uma solução de NaOH 0,1 N, utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador (solução 1%, Panreac) até obtenção de um tom rosa pálido. Os valores do volume de NaOH 0,1N

utilizado na titulação foram registados e os resultados foram expressos em percentagem de ácido oleico através da Equação 2.4, descrita seguidamente:

$$\text{Acidez (\% de ácido oleico)} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} \quad \text{Equação 2.4}$$

em que (*V*) representa o volume, em mL, de titulante, NaOH, gasto na neutralização dos ácidos; (*c*) representa a concentração em moles por litro, de titulante NaOH; (*M*) representa a massa molar, 282 g/mol, expressa em gramas por mol de ácido oleico; (*m*) a massa de mostra em g, utilizada inicialmente.

2.2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS

A determinação do índice de peróxidos realiza-se por iodometria em que a amostra dissolvida em ácido acético e clorofórmio é tratada com solução de iodeto de potássio. O iodo libertado valoriza-se com a solução de tiosulfato de sódio de normalidade conhecida. Os peróxidos consideram-se como os primeiros produtos da oxidação das gorduras e a sua formação segue, pelo menos durante as primeiras etapas, um desenvolvimento paralelo à quantidade de oxigénio absorvido. Existem vários fatores que influenciam a velocidade da oxidação das gorduras, como certas substâncias com carácter antioxidante que retardam esse processo e outros como a luz, o calor, as ligas metálicas e os catalisadores orgânicos que aceleram o processo de oxidação (Frias Ruíz *et al.*, 1999).

A análise foi realizada no LAQ-FCT UNL de acordo com a metodologia de análise descrita no anexo III do Regulamento CEE nº 2568/91, , alterado pelo Regulamento de Execução (UE) nº 2016/1784 da Comissão de 30 de setembro.

Para esta determinação foi realizado um ensaio em branco e em duplicado para cada uma das amostras. Pesaram-se 5 g de amostra de azeite na balança Explorer Pro EP213 e adicionaram-se 10 mL de clorofórmio, que se dissolveu rapidamente por agitação. Adicionaram-se 15 mL de ácido acético (99,8% de pureza, Carlo Erba Reagents) e seguidamente 1 mL de solução de iodeto de potássio (14 g de iodeto de potássio em cerca de 10mL de água destilada). Tapou-se e agitou-se durante 1 minuto e deixou-se 5 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Adicionaram-se cerca de 75 mL de água destilada. Procedeu-se à titulação do iodo libertado com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, com agitação e utilizando a solução de amido como indicador (solução de 10g/L). Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigénio ativo por kg, através da equação 4:

$$\text{Índice de peróxidos (meq O}_2\text{/kg)} = \frac{V \times T \times 1000}{m} \quad \text{Equação 2.5}$$

em que (V) representa o volume, em mL, de titulante, tiosulfato de sódio utilizado com a correção relativa ao ensaio em branco; (T) representa a molaridade da solução de tiosulfato de sódio, em mol/L; (m) é o peso da amostra, em gramas.

2.2.5 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES ESPECTOFOTOMÉTRICOS (K_{232}, K_{270})

Para a determinação dos índices espectrofotométricos utilizou-se a metodologia de análise descrita no anexo IX do Regulamento CEE nº2568/1991, alterado pelo Regulamento (CE) nº1989/2003 da Comissão de 6 de novembro e Regulamento de Execução (EU) 2015/1833 da Comissão de 12 de outubro. Os coeficientes de extinção K_{232} e K_{270} , absorção de 1% de solução m/v de iso-octano a 232 e 270 nm, respetivamente com 1 cm de comprimento de percurso, foram medidos utilizando um espectrofotómetro UV SPEKOL 1500 Analytik Jena, no Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (LEB-FCT UNL).

Pesaram-se 0,1 g de amostra de azeite na balança Explorer Pro EP213 completando o volume de 10 mL com o solvente ciclohexano (99% pureza, Lab-Scan) e homogeneizou-se no VWR Analog Vortex Mixer, de forma que a solução ficasse perfeitamente límpida. As leituras das absorvâncias foram lidas em espectrofotómetro SPEKOL 1500 Analytik Jena em células de quartzo, a um comprimento de onda de 232 nm e 270 nm. Para que os valores de extinção registados da absorvância a 232 nm estivessem compreendidos entre 0,1 e 0,8 foi necessária a diluição de 0,5 mL da solução inicial em 4,5 mL de ciclohexano.

As extinções específicas registadas nos diversos comprimentos de onda calculam-se pela seguinte equação 5:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s} \quad \text{Equação 2.6}$$

em que (K_{λ}) é a extinção específica no comprimento de onda 232 nm e 270 nm; (E_{λ}) é a extinção medida no comprimento de onda 232 nm e 270 nm; (c) é a concentração da solução em g/100 mL; e (s) o percurso ótico na célula de quartzo em cm.

Após medida a absorvância a 270 nm repetiu-se a medição a 266 nm e a 274 nm para determinar a variação de extinção específica (ΔK) dada pela equação 2.7:

$$\Delta K = \left| K_m - \left(\frac{K_{\lambda \text{máx}} - 4 + K_{\lambda \text{máx}} + 4}{2} \right) \right| \quad \text{Equação 2.7}$$

em que K_m é a extinção específica no comprimento de onda 270nm.

2.2.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR EM COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor em compostos fenólicos totais foi efectuada pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (Pires *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018b e 2019). O método baseia-se na redução de um complexo de molibdénio-tungstato-fósforo (solução de Folin-Ciocalteu), em meio básico, por parte dos compostos fenólicos existentes. Efectuam-se as leituras espectrofotométricas das absorvâncias a 760 nm após reacção das amostras com a solução Folin-Ciocalteu, e utilizando-se o ácido gálico como padrão (Singleton *et al.*, 1999). Desta forma, quanto maior for a quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra, maior será a absorvância a este comprimento de onda (Huang, *et al.*, 2005; Apak, *et al.*, 2007).

A determinação foi efectuada para três volumes diferentes de cada amostra de azeite: 0,1 mL, 0,05 mL e 0,02 mL, em tubos de ensaio, aos quais se adicionou água destilada até perfazer 1 mL. Para cada tubo de amostra diluída adicionou-se 3 mL de água destilada, 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se em vórtex VWR Analog Vortex Mixer para homogeneizar a solução. Após 2 minutos, adicionou-se 0,75 mL de uma solução de 5% (m/v) de carbonato de sódio e agitou-se novamente no vórtex. Os tubos foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Preparou-se um ensaio em branco do mesmo modo, mas com a substituição da amostra por água destilada. Todas as amostras foram preparadas em duplicado. Após este tempo de incubação, procedeu-se à leitura da absorvância no comprimento de onda de 760 nm em espectrofotómetro SPEKOL 1500 Analytik Jena no LEB-FCT UNL.

Para a realização da reta de calibração, seguiu-se o mesmo procedimento apenas substituindo a amostra por diferentes concentrações de ácido gálico, variando de 0 a 120 mg/L. Desta forma, os compostos fenólicos totais das amostras foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A quantificação das propriedades de sequestro de radicais foi observada pela redução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), como descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Esta molécula tem cor púrpura e possui um eletrão desemparelhado, em que a doação de um hidrogénio leva à perda da sua absorção específica a 517 nm; o radical vai desaparecendo, dando lugar à hidrazina correspondente, alterando a cor de púrpura para amarelo. Desta forma, a atividade antioxidante pode ser determinada através da avaliação da diminuição da absorção do DPPH a 517 nm (Magalhães *et al.*, 2008; Micelli *et al.*, 2009; Moon e Shibamoto, 2009).

A determinação da atividade antioxidante efetuou-se no LEB-FCT UNL de acordo com o método de capacidade de sequestro do radical DPPH segundo Magalhães *et al.* (2008), Moon e Shibamoto (2009) e Miceli *et al.* (2009).

Para esta determinação as amostras foram diluídas a diferentes concentrações com etanol. Adicionou-se 3 mL de solução etanólica DPPH e 1 mL de amostra em tubos de ensaio que foram incubados no escuro durante 20 minutos e à temperatura ambiente. As leituras das absorvâncias foram lidas no espectrofotómetro SPEKOL 1500 Analytik Jena, a um comprimento de onda de 517 nm. Realizou-se também um controlo em que no lugar da amostra se adicionou 1 mL de etanol. Foi realizada uma curva de calibração com ácido ascórbico com diferentes concentrações. A atividade antiradicalar das amostras relativamente ao DPPH pode ser expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por mL, em que a percentagem de inibição é calculada através da Equação 2.8:

$$\% \text{ Inibição (mgEAA/mL)} = (\text{Abs}_{\text{sem amostra}} - \text{Abs}_{\text{com amostra}} / \text{Abs}_{\text{sem amostra}}) \times 100 \quad \text{Equação 2.8}$$

Os resultados obtidos foram expressos em mg EAA/kg de azeite, tendo-se utilizado o valor 0,916 g/L de densidade do azeite (COI, 1996).

2.2.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO K_{225}

A intensidade do sabor amargo pode ser determinada pelo método desenvolvido por Jimenez *et al.* (1992), baseado na extração dos constituintes amargos com metanol e a medição do coeficiente de extinção específico a 225 nm. Mateos *et al.* (2014) desenvolveram um método rápido de determinação do amargo sem prévia separação dos compostos fenólicos do azeite através de uma extração sólido-líquido. Este método baseia-se na alteração do espectro dos compostos fenólicos do azeite como consequência da modificação do pH do meio.

Para esta análise, efetuada no LEB-FCT UNL, foi necessário preparar a solução tampão Britton-Robinson pH 5 e as amostras de azeite. Num balão volumétrico adicionaram-se 6,8 mL de ácido ortofosfórico 1M e 5,7 mL de ácido acético 1M. Pipetou-se 0,5 mL dessa solução, 1,6 mL de ácido bórico 0,3 M e água destilada até perfazer 100 ml. Ajustou-se o pH a 5 com hidróxido de sódio 0,1N no medidor Crison Micro pH 2001 para obtenção da solução tampão Britton-Robinson pH 5. Num tubo de ensaio colocaram-se 4 gotas de azeite (aproximadamente 0,13 gr.) e adicionaram-se 13,5 mL de propanol e 1,2 mL de solução tampão Britton-Robinson pH 5, agitou-se vigorosamente com a finalidade de obter uma solução perfeitamente transparente. Avaliou-se a absorvância a 225 nm. Introduziu-se no tubo de ensaio 50 μ L hidróxido de sódio a 1% e repetiu-se cada 60 segundos correspondendo a primeira leitura ao tempo inicial de 0 segundos. Este procedimento é repetido de forma contínua durante 300 segundos. Durante todo o processo realiza-se uma monitorização contínua da absorvância da solução. Finalmente calcula-se a diferença entre a absorvância final e inicial ($A_{300s} - A_{0s}$). Tal como se observa na Figura 2.4 é possível correlacionar a diferença da absorvância ($A_{300s} - A_{0s}$) com a medida convencional do amargo a 225 nm.

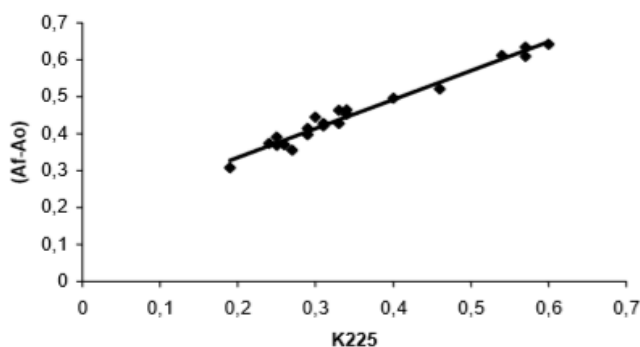


Figura 2.4 – Correlação linear entre ($A_{300s} - A_{0s}$) e K_{225} (Mateos *et al.*, 2014)

A reta do gráfico da figura 2.4 é representada pela Equação 2.8:

$$Y = 0,7823 x + 0,1796 \quad (R^2 = 0.9715) \quad \text{Equação 2.8}$$

em que ($Y = (A_{300s} - A_{0s})$) representa o incremento da absorvância ao fim de 300 s e (x) representa o K_{225} . Os valores de absorvância das amostras foram aplicados à equação da reta para obtenção dos valores de K_{225} das diferentes amostras de azeite (Mateos *et al.*, 2014).

2.2.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES

2.2.9.1 Extração da fase fenólica das amostras

Para a determinação do teor de flavonóides por métodos colorimétricos foi necessário efetuar um pré-tratamento das amostras para a extração dos compostos fenólicos polares tendo sido adotado o procedimento de Gouvinhas *et al.* (2015).

Foram utilizados 4 mL de amostra de azeite num tubo de ensaio, seguindo-se a adição de 2,5 mL de hexano e 2,5 mL de mistura 80:20 de MeOH e água milli-Q (água ultra-pura). A mistura foi agitada no vórtex VWR Analog Vortex Mixer durante 3 minutos e após decantação a fase inferior foi cuidadosamente retirada e reservada para um novo tubo de ensaio. À mistura restante adicionou-se 2,5 mL de hexano e 2,5 mL de MeOH e água milli-Q (80:20), sendo agitada no vórtex durante 3 minutos. Após decantação da solução a fase inferior foi recolhida para o tubo de ensaio anterior. Este procedimento repetiu-se novamente.

2.2.9.2 Teor de flavonóides

Os flavonóides totais foram medidos pelo método de complexação com o alumínio na presença de nitrito (Barros *et al.*, 2010).

Para esta determinação foram adicionados num tubo de ensaio 500 μ L da solução de amostra resultante do procedimento de extração anterior, descrito em 2.2.9.1, e 150 μ L de NaNO_2 a 5% p/v. Após 6 minutos à temperatura ambiente adicionou-se 150 μ L de AlCl_3 a 10% p/v, agitou-se em vortex VWR Analog Vortex Mixer para homogeneizar a solução. Após 6 minutos adicionou-se 2 mL de NaOH a 4% p/v e água mili-Q até perfazer o volume de 5 mL, e agitou-se

novamente no vórtex. Os tubos foram incubados no escuro durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Foram realizados dois ensaios em branco: um branco preparado do mesmo modo, mas com a substituição da amostra por água e um branco preparado do mesmo modo com a substituição dos reagentes com exceção do NaOH. Todas as amostras foram preparadas em triplicado com diferentes concentrações de 500 µL, 250 µL e 100 µL. Após este tempo de incubação procedeu-se à leitura da absorvância no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotómetro PHARMACIA LKB – Novaspec II no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Tecnologia da Biomassa da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (LQA-FCT UNL).

Realizou-se uma curva de calibração de catequina em diferentes concentrações (0 – 100 mM /mL) e os resultados foram expressos em mM equivalentes de catequina (mMEC/mL).

2.2.10 DETERMINAÇÃO DA COR

2.2.10.1 Pigmentos (carotenóides e clorofila)

A determinação dos pigmentos (clorofila e carotenóides) efetuou-se de acordo com o método desenvolvido por Minguez-Mosquera *et al.* (1991). A fração de clorofila a 670 nm e a fração de carotenóides a 470 nm foram avaliadas a partir do espectro de absorção de 1,5 g de amostra de azeite dissolvido em ciclohexano (5 mL) em células de quartzo. As leituras das absorvâncias foram efetuadas no espectrofotómetro PHARMACIA LKB modelo Novaspec II, do LQA-FCT UNL. Os teores de clorofila e caroteno são expressos em mg de clorofila por quilo de azeite e mg de carotenóides por quilo de azeite, e calculados conforme as Equações 2.9 e :

$$\text{Clorofila (mg/kg)} = \frac{(A_{670} \times 10^6)}{(613 \times 100 \times d)} \quad \text{Equação 2.9}$$

$$\text{Carotenóides (mg/kg)} = \frac{(A_{470} \times 10^6)}{(2000 \times 100 \times d)} \quad \text{Equação 2.10}$$

em que (A) é a absorvância lida e (d) a espessura da célula espectrofotométrica (1 cm).

2.2.10.2 Escala CIELAB

As leituras foram efetuadas no colorímetro CR-410, Konika Minolta, em triplicado, no LAQ-FCT UNL, que foi previamente calibrado com uma cerâmica branca. Para determinação da cor calculou-se o valor de Chroma (c^*) (Equação 2.11) e ângulo de Hue (Equação 2.12) pelos valores de a^* e b^* obtidos nas leituras, através da seguinte equação (Pastor *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018c).

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Equação 2.11}$$

$$\text{Ângulo de Hue} = \arctan^{-1}(b/a), a > 0; \arctan^{-1}(b/a) + 180, se < 0 \quad \text{Equação 2.12}$$

2.2.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE OLEOCANTAL E OLEACEÍNA

Existem vários tipos de análise para determinar os teores de oleocantal e de oleaceína. A técnica mais utilizada e reconhecida pelo COI é por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). As técnicas por espectrofotometria de massas (LS-MS/MS) e por ressonância magnética nuclear (RMN), técnica mais recente e precisa, também são utilizadas. Maggitis e Melliou, investigadores responsáveis pela técnica RMN (Karkoula *et al.*, 2012) desenvolveram um *kit* de baixo custo (Aristoleo® Test Kit) para determinação colorimétrica rápida que permite selecionar o azeite com teores elevados de compostos fenólicos no lagar (Cirimina *et al.*, 2016), sendo parceiros no Programa Aristoil Interreg Mediterraneum financiado pela União Europeia para estudar a produção desta categoria de azeite.

Através de uma escala de cores, o Aristoleo® Test Kit, calibrado por RMN (Ressonância Magnética Nuclear), possibilita aos produtores de azeite uma análise rápida e económica aos lotes de azeite virgem extra, permitindo determinar valores de oleocantal e de oleaceína entre 50 a 1000 mg por kg de azeite. Estes compostos fenólicos são considerados como promotores de saúde pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Aristoleo, 2018).

Para as diferentes amostras de azeite foram determinados os teores de oleocantal e oleaceína de acordo com as instruções do Aristoleo® Test Kit, em duplicado (Figura 2.5). Transferiram-se 7,5 ml de azeite para o frasco Aristoleo com a ajuda de uma pipeta, até o seu nível coincidir com as setas do rótulo do frasco. Utilizando a seringa fornecida pelo kit removeu-

se do frasco A o ácido acético para o frasco para injetáveis e agitou-se durante 30 segundos. Seguidamente com a seringa removeu-se lentamente todo o conteúdo do frasco B e introduziu-se no frasco Aristoleo de 12 mL. Agitou-se vigorosamente por 30 segundos e deixou-se repousar por 60 segundos. Removeu-se o conteúdo do frasco C e introduziu-se no frasco Aristoleo que após 30 segundos de agitação se deixou em repouso durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após esse período observou-se a cor do líquido na parte inferior do frasco Aristoleo e comparou-se com o índice de cores representado na Figura 2.6.

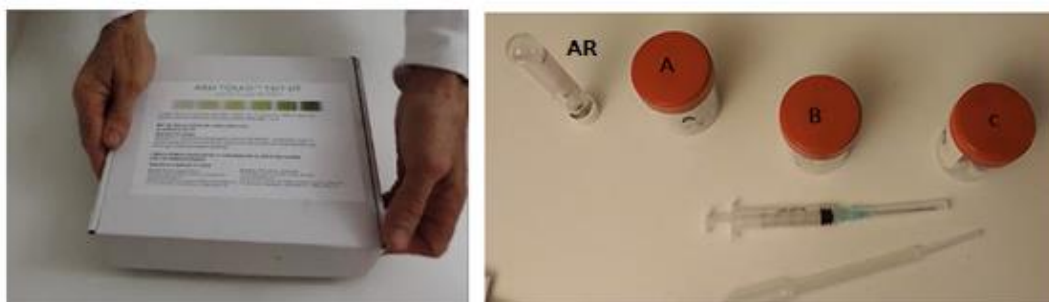


Figura 2.5 –Aristoleo® Test Kit e respetivo material (seringa, pipeta Pasteur, frasco Aristoleo AR, escala Aristoleo, frasco A, B, C) preparado para 10 análises(Aristoleo, 2018)



Figura 2.6 – Escala de cores do Aristoleo® Test Kit para determinação da combinação total de oleocanthal e oleaceína (mg/kg) (Aristoleo, 2018)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ÍNDICE DE MATURAÇÃO

O período de maturação é considerado como o tempo que decorre desde o aparecimento de manchas violáceas até à coloração definitiva da pele e da polpa da azeitona (Humanes, 1992), sendo influenciado pelas condições edafo-climáticas e características varietais (Hermoso *et al.*,1998). Na maioria das variedades, a maturação dos frutos na mesma planta não ocorre em simultâneo, mas de forma escalonada (Humanes & Civantos, 2001), como se pode verificar nas amostras recolhidas (Figura 3.1).



Figura 3.1 – Azeitonas de diferentes cultivares utilizadas no ensaio e respetivas datas de colheita

O aparecimento de manchas violáceas nos frutos marca o início da maturação que podem surgir junto ao ápice, na região de inserção do pedúnculo, ou aleatoriamente. Ao longo da maturação, a acumulação de antocianinas aumenta e progride a coloração violácea na epiderme até ficar totalmente negra em algumas variedades. Cada variedade apresenta um padrão geneticamente determinado de coloração dos frutos, mas que está condicionado pelas condições climáticas observadas em cada ano, pela produção de frutos em cada oliveira e pelo estado sanitário. A época de maturação é uma característica varietal, existindo variedades temporãs (como a Arbequina e a Blanqueta) e variedades tardias (como a Verdeal de Serpa) (Cordeiro & Inês, 2017).

Da comparação entre o estudo da evolução da maturação durante a campanha de 2015/2016 realizado por Cordeiro *et al.* (2016) na Coleção Portuguesa de Referência de Cultivares de Oliveira (CPRCO) em Elvas para as variedades Cobrançosa, Galega vulgar e Verdeal de Serpa (Figura 3.2) e os resultados obtidos, é possível comparar pela Figura 3.1 que os comportamentos relativamente ao estado de maturação aparentam ser semelhantes.

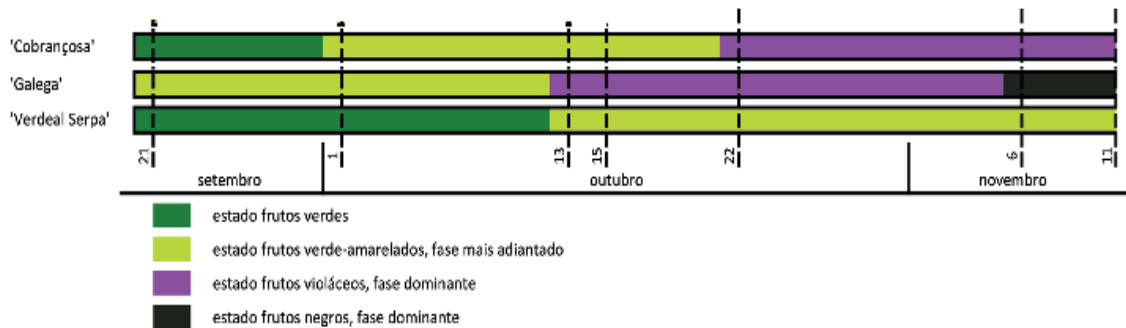


Figura 3.2 - Evolução da maturação na CPRCO na campanha 2015-2016 (adaptado de Cordeiro *et al.*, 2016)

A avaliação do estado de maturação da azeitona é fundamental para a tomada de decisão quanto ao momento mais oportuno para realizar a colheita. Durante o período de maturação ocorrem diversas modificações bioquímicas no fruto, muitas das quais expressas por alterações de coloração (Beltrán *et al.*, 2004), que surgem sob uma base genética, influenciadas por diversos fatores ambientais, fitossanitários e idade da árvore (Connor & Fereres, 2005) provocando mudanças substanciais nos perfis de fenóis, tocoferóis, clorofilas e carotenóides (Matos *et al.*, 2005). Como tal, é comum a utilização de um *Índice de Maturação* (IM) baseado na cor dos frutos (Hermoso *et al.*, 1998; COI, 2011), cujos valores têm sido aferidos para diferentes cultivares nos últimos anos (Casas & Bueno, 2003).

O IM é utilizado para determinar o momento ótimo de colheita em que o azeite se encontra totalmente formado. Para as variedades que desenvolvem normalmente a cor esse momento corresponde a um IM próximo de 3,5. Para este valor a maioria dos frutos está a mudar a cor da pele (categorias 2 e 3), alguns já apresentam pele negra (categoria 4 ou superior) e poucos a pele verde amarelada (categoria 1) (Hermoso *et al.*, 1991).

Os resultados obtidos na determinação do índice de maturação das azeitonas das diferentes cultivares à data de colheita são apresentados na Figura 3.3. Consoante a variedade, o IM variou entre o valor de 1,02, na variedade Arbequina, que corresponde a frutos de cor verde

ligeiramente amarelada e o valor de 4,18, na variedade Galega vulgar, que corresponde a um estado de maturação mais avançado, com os frutos de pele totalmente negra e a polpa roxa em menos de 50%.

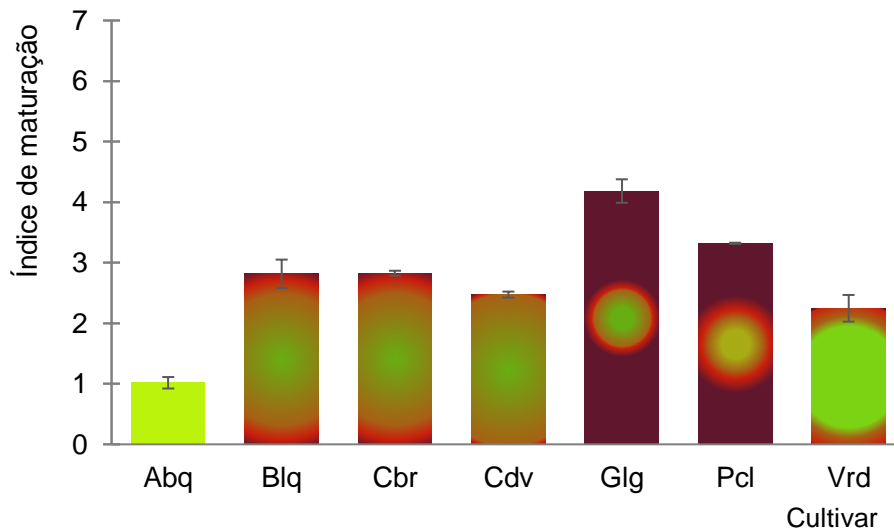


Figura 3.3 – Valores médios e desvio padrão do índice de maturação das diferentes amostras de azeitona (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Estima-se que para as variedades cujos frutos ficam completamente negros o momento ótimo de colheita se atinge quando o valor do índice de maturação for próximo de 3 (Humanes & Civantos, 2001), tal como se verificou para a cv. Galega vulgar e cv.Picual que apresentam um IM de 4,18 e 3,32, respetivamente, seguidos da cv.Blanqueta, dacv. Cobrançosa e da cv.Cordovil, com IM de 2,83, 2,82 e 2,47, respetivamente. No entanto, existem variedades cuja epiderme permanece verde, esbranquiçada ou violácea em que o valor do IM para o momento ótimo de colheita é próximo de 2 (Humanes & Civantos, 2001), como é o caso da cv.Arbequina e da cv. Verdeal de Serpa que apresentam IM mais baixo, de 1,02 e 2,25, respetivamente.

A variação do IM entre os diferentes estados de maturação é crescente e gradual ao longo do tempo, tal como referido por Ramalheiro (2009) para as cvs. Cordovil e Picual provenientes da região de Lisboa, que determinou no início de novembro de 2008 um IM de 2,7 e 4,2, respetivamente, valores ligeiramente superiores aos obtidos. No entanto para a cv. Cordovil de Serpa, na região Alentejo, Baer na mesma data de colheita obteve um valor semelhante com um IM de 2,35, sendo este valor ligeiramente inferior ao IM obtido de 2,47, na penúltima semana de

novembro na região de Moura, Alentejo. A localização do olival influencia a evolução do IM além de outros fatores (Baer, 2015).

O momento ótimo de colheita está também associado às características dos azeites. A partir de azeitonas no estado inicial de maturação obtêm-se azeites de cor verde, mais aromáticos e frutados, enquanto que de azeitonas em plena maturação resultam azeites cor dourada e menos frutados. Efetivamente, segundo Herrera *et al.* (2012) para cada variedade pode obter-se um azeite com diferentes intensidades nos seus atributos sensoriais, pois à medida que a maturação avança o azeite obtido é menos intenso tanto em aroma como em sabor. Com base neste critério seria expectável que todos os azeites obtidos seriam frutados e de cor verde como se verifica no ponto 3.10, com exceção da cv. Galega vulgar que apresentou um valor de IM mais elevado, coloração menos verde e provavelmente um frutado menos intenso.

Manter as azeitonas na árvore após alcançarem a plena maturação não traduz uma boa prática, pois verifica-se a acumulação de substâncias derivadas da degradação do azeite, que prejudicam a sua qualidade química e sensorial. Um dos defeitos sensoriais que pode surgir é induzido pela geadas, que provoca o enrugamento da azeitona por perda de água e origina o defeito “madeira” (Cordeiro *et al.*, 2016).

Na determinação do IM da cv. Galega vulgar proveniente da região de Elvas em três campanhas diferentes, verificou-se grande reprodutibilidade entre as amostras e os valores obtidos, entre 4,5 e 4,7 \pm 0,1, não variaram de forma significativa (Vaz-Freire *et al.*, 2007). O valor obtido de 4,18 no momento ótimo de colheita para a mesma cultivar no início de novembro aproxima-se desses valores.

Num estudo com a cv. Arbequina observou-se como a maturação do fruto varia em função das condições de produção. O IM dos frutos produzidos em regime de sequeiro é sempre superior aos frutos produzidos em regime de regadio, alcançando no início de dezembro valores de IM de 3,86 e 1,98 para sequeiro e regadio, respetivamente (Ortega *et al.*, 2004). Verifica-se que existe semelhança entre a amostra da cv. Arbequina deste ensaio, que provém de um olival de regadio, IM de 1,02, mas ligeiramente inferior ao IM de 1,98 referido pelos autores, pois a data de colheita é anterior, em 22 de novembro, e como já foi referido ocorre uma evolução do IM ao longo do tempo.

Em outro ensaio sobre a influência do processo de maturação na qualidade sensorial do azeite proveniente das variedades Picual, Hojiblanca e Picuda comprovou-se que o perfil sensorial característico de um azeite evolui durante a maturação do fruto, permitindo estabelecer uma data ótima de colheita de azeitona com o objetivo de obter azeites de maior qualidade sensorial (Jiménez *et al.*, 2012). Para a cv. Picual colhida em meados de novembro obteve-se um IM de 2,8 e um azeite muito frutado, com um amargo médio e um suave picante (Jiménez *et al.*, 2012), semelhante ao valor obtido para a mesma data, com um IM 3,32.

Por ser uma variedade temporã a cv. Blanqueta apresenta um IM próximo da cv. Arbequina, IM de 2,82. Além disso, apresenta uma elevada queda natural a partir do início da maturação, razão pela qual se recomenda a realização da colheita nesse estado (Cordeiro *et al.*, 2016). Já as azeitonas da cv. Verdeal de Serpa por terem uma maturação tardia e apresentarem uma elevada resistência ao desprendimento, apresentam um valor de IM de 2,25 que está de acordo com os valores referidos por Humanes & Civantos (2001).

Em relação ao índice de maturação todas amostras recolhidas apresentaram valores coincidentes com o momento ótimo de colheita.

3.2 RENDIMENTO, HUMIDADE, GORDURA TOTAL E GORDURA NA MATÉRIA SECA

A determinação dos dois componentes principais da azeitona, o azeite e a água de vegetação, têm uma primordial importância. O conteúdo total em azeite além de ser um parâmetro necessário para avaliar o rendimento do processo de extração num lagar é a base para o pagamento da azeitona aos agricultores. Por outro lado, a água de vegetação da própria azeitona afeta as diferentes variáveis de regulação do sistema de laboração que estão relacionados com o rendimento industrial. No sistema de extração de duas fases é sobretudo onde esta informação é útil permitindo a regulação da posição relativamente ao eixo de rotação e ponto de saída do azeite e a adição da água ao decantador centrífugo (Hermoso *et al.*, 1998a).

Apesar das recomendações quanto à decisão da época de colheita terem também em conta outros critérios, nomeadamente a resistência ao desprendimento e a firmeza da polpa face à colheita mecânica, a suscetibilidade a pragas e doenças, a ocorrência de geadas em certas regiões e a colocação no mercado de azeites com características distintas a nível sensorial (Aparicio & Luna, 2002; Rotondi *et al.*, 2004), o teor em gordura que habitualmente se relaciona

com o índice de maturação (IM) continua a ser uma indicação fundamental para definir o rendimento em azeite. No entanto, existem variedades que não desenvolvem cor, mantêm-se verdes durante a maturação e o IM não é um bom indicador para determinar o momento ótimo de colheita. Por este motivo analisam-se diferentes parâmetros indicativos, como o rendimento em gordura sobre a matéria húmida ou gordura total (GMH ou GT), o rendimento em gordura sobre a matéria seca (GMS) e o teor de humidade da azeitona (H) (Baltasar, 2014).

O teor de humidade (H) é o parâmetro que mais varia nas diferentes amostras de azeitona, como se verifica na Figura 3.4. O valor mais baixo de $43,8\% \pm 1,3$ corresponde às azeitonas da cv. Verdeal de Serpa e o valor mais elevado, de $59,6\% \pm 0,6$ corresponde às azeitonas da cv. Galega vulgar.

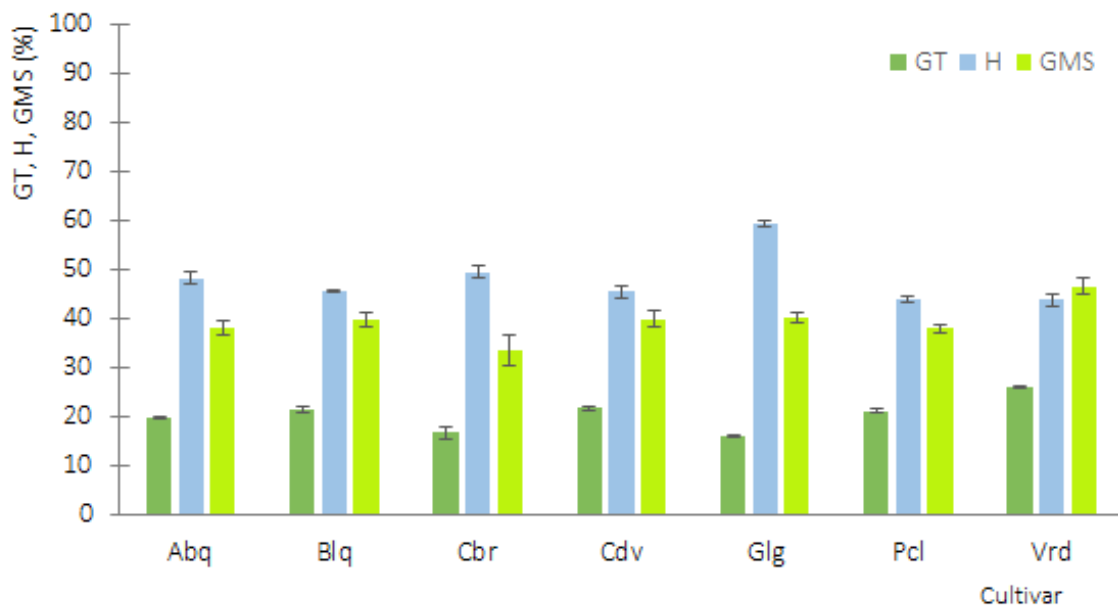


Figura 3.4 – Valores médios e desvio padrão da Gordura total (GT), Humidade (H) e Gordura na matéria seca (GMS) das diferentes amostras de pasta de azeitona obtidos pelo equipamento Foss Olivia™ em percentagem (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa).

No estudo de Vaz-Freire *et al.* (2007) durante as campanhas de 2002 a 2004 na região de Elvas, os valores de H para a cv. Galega vulgar foram inferiores oscilando entre 43,90% e 46,38% ($\pm 2,73$). De acordo com Hermoso *et al.* (1998) o teor de humidade da pasta de azeitona está estreitamente relacionado com os condicionalismos edafo-climáticos. A humidade depende principalmente do estado de maturação das azeitonas e da meteorologia no período anterior à

colheita (precipitação e geadas), assim como de fatores agronómicos como a rega (Baltasar, 2014). Efetivamente, as amostras de Galega vulgar foram colhidas mais cedo, no início de novembro, após dias com ocorrência de precipitação (COTR, 2017) estando de acordo com o referido na bibliografia. Os frutos com elevado teor de humidade produzem geralmente pastas “difíceis” no lagar, afetando negativamente a qualidade do azeite obtido (Jiménez *et al*, 2013). Por outro lado, a cv. Verdeal de Serpa apresenta o valor menor de 43,8%, tendo sido colhida em 19 de dezembro. Esta evidência poderá confirmar as observações feitas por Jiménez *et al* (2013) que referem que a humidade da azeitona, paralelamente à acumulação de azeite, diminui progressivamente ao longo da maturação, diminuindo normalmente a partir de dezembro com a descida da temperatura ambiente, como se verificou nesse período (COTR, 2017).

A quantidade de *gordura total* (GT) é uma característica da variedade. As condições climáticas, as práticas culturais, o estado sanitário e a quantidade de frutos na copa da árvore originam variações no rendimento em gordura de uma campanha para a outra (Cordeiro *et al.*, 2016).

Nos estudos de fenologia Cordeiro *et al.* (2016) consideram que o azeite produzido na azeitona se acumula no fruto seguindo ao longo do tempo uma curva sigmoideal em que se distinguem três fases. A primeira fase, biossíntese lenta, decorre até ao endurecimento do caroço (estado fenológico H), em que o fruto se comporta como um tecido vegetal fotossintético que praticamente não acumula azeite como lípido de reserva. Uma segunda fase, biossíntese acelerada, tem uma duração de 18 a 22 semanas em que a quantidade de azeite aumenta rapidamente. O período de maior formação de azeite é considerado quando atinge uma alteração da cor do fruto de verde intenso a verde amarelado. A terceira fase corresponde aos frutos maduros em que a quantidade total de azeite não varia.

A acumulação de gordura na azeitona inicia-se em julho, após o endurecimento do endocarpo, e prolonga-se até ao final da maturação dos frutos. O período de crescimento e desenvolvimento da azeitona é, comparativamente ao de outras fruteiras de caroço, muito prolongado (de 6 a 7 meses), existindo diferenças devidas às variedades, às condições culturais e à quantidade de frutos na árvore (Cordeiro & Inês, 2017).

Cordeiro e colaboradores classificam algumas variedades em função do seu rendimento médio em gordura, considerando a Galega vulgar como aquela que apresenta baixos valores em

rendimento, a Cobrançosa com valores médios e a Blanqueta com valores elevados (Cordeiro *et al.*, 2016). Os resultados obtidos estão de acordo com essa classificação em que a cv. Galega vulgar apresenta o menor valor de 16,3% e a Blanqueta 21,6% (Figura 3.4), no entanto a cv. Cobrançosa apresenta valores de 16,9%, mais baixos do que seria esperado e a cv. Blanqueta $21,6\% \pm 0,7$ (Figura 3.4) com o valor mais elevado.

O conteúdo em azeite expresso em *gordura na matéria seca* (GMS) foi sempre superior ao conteúdo em azeite expresso em GT. Pelos resultados obtidos podemos verificar que apesar das diferentes azeitonas estarem com valores muito próximos de 40%, a GMS varia consoante as cultivares entre $33,6\% \pm 3,2$ na cv. Cobrançosa e $46,7\% \pm 1,5$ na cv. Verdeal de Serpa, o valor mais elevado, por se tratar de uma variedade de rendimento médio-elevado conforme a bibliografia (COI,2000). A cv. Cobrançosa apesar de ser considerada uma variedade de rendimento médio (Cordeiro *et al.*, 2016; COI,2000), com um IM inferior a 3, o valor de GMS confirma que a formação do azeite ainda está em curso.

Um estudo com a cv. Galega vulgar demonstra que o teor em gordura tende a estabilizar para valores acima de 40% na matéria seca, quando os valores do IM são cerca de 3,5 e 4,0 e muito próximos de 3,0 na cv. Cobrançosa (Peres *et al.*, 2012). Neste trabalho a cv. Galega vulgar apresenta um IM próximo de 4 e GMS próximo de 40% o que podemos afirmar que se encontra no momento ótimo de colheita, no entanto a cv. Cobrançosa apresenta um IM de $2,83 \pm 0,04$ e GMS de $33,6\% \pm 3,2$, valores próximo ao momento ótimo de colheita.

A classificação das azeitonas em função da percentagem de GMS foi elaborado por Tous e Romero que consideram um rendimento elevado os valores superiores a 46%, um rendimento médio os valores entre 46 e 38%, e um rendimento baixo os valores inferiores a 38%. Atendendo a esta classificação, as cultivares estudadas entre a mudança da cor e o estado maduro estariam incluídas nas variedades classificadas como rendimento médio com exceção da Verdeal de Serpa (>46%) com rendimento elevado (Tous & Romero, 1993).

Como se pode verificar na Figura 3.4 à medida que a H diminui aumenta o rendimento em GT, o que explica que a GT não é um dado fiável para decidir o momento em que se atinge o máximo de teor de gordura na azeitona. Vejamos o caso da cv. Galega vulgar colhida no início de novembro com valores de H de $59,6\% \pm 0,6$, em que detém uma GT de $16,3\% \pm 0,2$ e apresenta uma GMS de $40,4\% \pm 1,1$ e IM de $4,18 \pm 0,19$. No estudo de Vaz-Freire e seus colaboradores em

três campanhas diferentes com a cv. Galega vulgar proveniente da região de Elvas, relativamente à determinação por RMN da H (43.90% a 46.38% $\pm 1,33$), da GT (21.85% a 27.28%, $\pm 2,73$) e GMS (40,46% a 48,63%, $\pm 4,09$), foi possível verificar que não existem grandes diferenças entre as campanhas em estudo e que o azeite se encontrava formado no momento da colheita (Vaz-Freire *et al.*, 2007) Os valores obtidos no presente ensaio confirmam que no estado de maturação de mudança de cor, apesar do valor de H elevado o azeite já se encontra formado e a GMS é semelhante à bibliografia consultada. Esta evidência confirma que se deve eliminar a influência da humidade calculando a GMS em cada amostra.

Apesar do ensaio não acompanhar a evolução da maturação para as diferentes cultivares, considerou-se que a data de colheita das amostras seria coincidente com a data normal de colheita do agricultor. Efetivamente, pelos resultados obtidos e considerando as indicações da literatura referidas, as cultivares encontravam-se no momento ótimo de colheita com exceção da Cobrançosa que ainda não apresentava todo o azeite formado e a Galega que apesar de ter o azeite formado apresentava valores elevados de humidade.

O *rendimento industrial* obtém-se a partir da informação que os diferentes métodos oferecem para a determinação do conteúdo em azeite, realizando uma correção mediante o uso de um fator variável que depende da H, da GMS, da extratibilidade e do conteúdo de gordura no bagaço, entre outros (Civantos, 1999). O rendimento industrial (Figura 3.5) varia entre 12,07% $\pm 0,35$ na cv.Galega vulgar e 18,80% $\pm 0,7$ na cv.Picual. A cv. Cobrançosa foi o segundo valor mais baixo com 13,33% $\pm 0,25$, seguido da cv. Verdeal de Serpa com 16,30% $\pm 0,98$, a cv. Arbequina com 17,63% $\pm 1,12$, a cv.Cordovil com 18,13% $\pm 0,40$ e a Blanqueta 18,77% $\pm 0,15$.

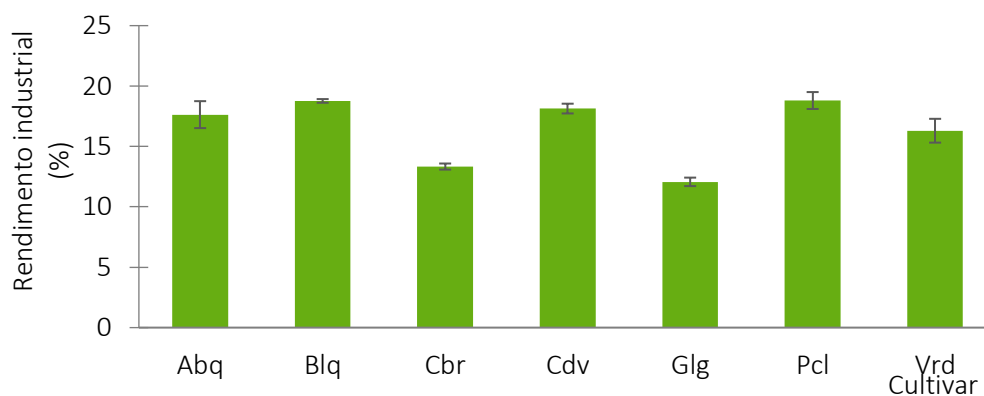


Figura 3.5 – Valores médios e desvio padrão do Rendimento industrial, em percentagem, das diferentes amostras de azeitona na extração do azeite pelo equipamento Abencor (Abq= Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Nas indústrias apesar do rendimento em gordura ser uma informação útil, interessa também determinar o grau de *extratabilidade* da pasta de azeitona que indica a maior ou menor facilidade com que o azeite pode ser extraído, dependendo das suas características (Jiménez *et al.*, 2006). Uma prática habitual e permitida é a adição de quantidades variáveis de coadjuvante tecnológico (microtalco natural) às pastas de azeitona difíceis, para melhorar a extração do azeite mediante o sistema Abencor (Uceda & Hermoso, 1987). No nosso estudo não foi adicionado coadjuvante com o fim de observar o comportamento de cada pasta.

Durante a extração do azeite pelo sistema Abencor foi possível observar que algumas pastas de azeitona se comportam de forma diferente na fase da moenda, do batimento da pasta e na separação sólido-líquido (Figura 3.6). A cv. Galega vulgar apresentou uma pasta de azeitona praticamente líquida, em que os 30 minutos de batimento da pasta não foram suficientes e a cv. Verdeal de Serpa em que os 30 minutos de batimento da pasta provocaram emulsões dificultando a separação sólido-líquido. Foi notório também a influência do baixo grau de humidade das azeitonas na moenda e restantes fases do processo no caso da cv. Arbequina, com exceção da cv. Galega vulgar que apresentava teor de H mais elevado que dificultou a operação de extração do azeite. Pelo contrário, nas cvs. Blanqueta e Picual foi possível extrair o azeite com facilidade.



Figura 3.6 – Aspeto das diferentes pastas de azeitona após a fase de moenda.

O baixo grau de extratibilidade além de ser inerente à própria genética da variedade, também pode ser influenciado entre muitos fatores pelas condições climatológicas anormais, o ataque de certas pragas e doenças, o tipo de fertilização, forma e época em que se realiza (Uceda & Hermoso, 1987).

No estudo de Peres e seus colaboradores a cv. Cobrançosa com um IM de 3,05, H de 58% e GT de 19% (45,2 % GMS), apesar de apresentar um bom grau de extratibilidade demonstra grandes dificuldades de extração sempre que os frutos possuem elevada humidade, o que sucede quando os frutos têm origem em olivais de regadio ou em anos de elevada precipitação, obtendo um rendimento Abencor médio (sem adição de adjuvantes) de 11,7% e grau de extratibilidade de 62% (Peres *et al.*, 2012a). No presente ensaio o rendimento foi ligeiramente mais alto com um valor de $13,3\% \pm 0,25$ e uma extratibilidade de $79,1\% \pm 4,14$ (Figura 3.7), valor superior resultante de um teor de humidade menor tal como referido.

Quando comparado com o estudo de Pita e colaboradores pelo sistema Abencor com a cv. Galega vulgar, IM de 4,5 que obtiveram um rendimento de 7,96%, aumentando este valor para 10,71% com a adição de microtalco natural como adjuvante tecnológico após 30 minutos de termobatedura (Pita *et al.*, 2011). Apesar do IM estar muito próximo da cv. Galega deste ensaio o rendimento foi $12,07\% \pm 0,35$, superior ao referido no estudo, contudo o grau de extratibilidade de $74,03\% \pm 1,80$ apesar de aceitável é dos mais baixos entre as variedades do ensaio.

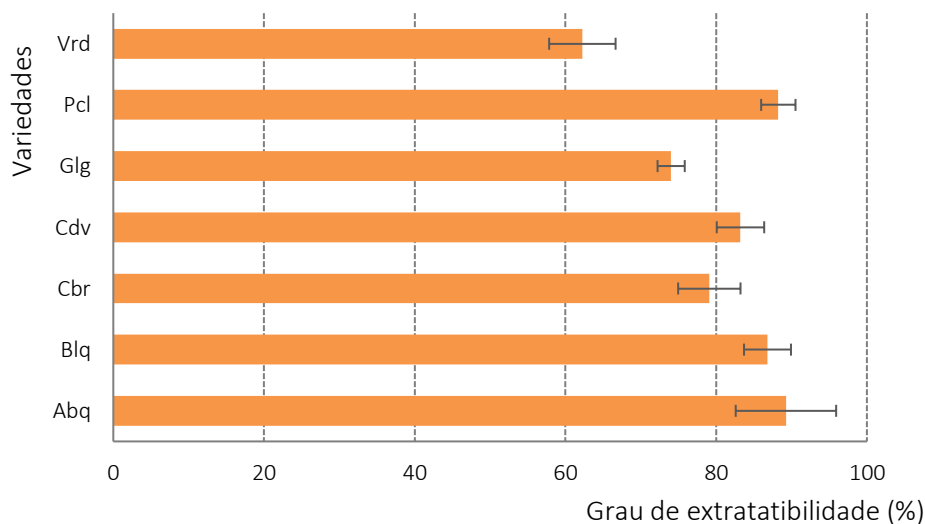


Figura 3.7 – Valores médios e desvio padrão do grau de extratibilidade, em percentagem, das diferentes amostras de azeitona (Abq= Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

O acompanhamento da maturação da azeitona é uma ferramenta expedita que o olivicultor tem à sua disposição para avaliar e decidir sobre a oportunidade de colheita em cada campanha, minimizando as perdas de produção e de perda da qualidade do produto (Cordeiro *et*

al., 2016). Assim, pelos resultados obtidos praticamente todas as amostras de azeitona se encontravam no momento ótimo de colheita, com exceção da cv.Cobrançosa que não tinha o azeite todo formado e a cv. Galega vulgar que apesar de ter o azeite formado apresentava um teor de humidade elevado que poderia dificultar o processo de extração do azeite.

3.3 ÁCIDOS GORDOS LIVRES

O teor em ácidos gordos livres é expresso em percentagem de ácido oleico (Anexo II do Regulamento 2568/1991). Este parâmetro químico é um dos principais critérios para a classificação do azeite nos diferentes níveis de categorias de qualidade comercial constituindo um indicador de qualidade da matéria-prima (Cayuela *et al.*, 2009; COI, 2016; Reg. CEE 2568/91 de 11 de julho, Anexo II). Os ácidos gordos livres presentes no azeite resultam da hidrólise dos triglicéridos que por serem mais propensos à oxidação aumentam a possibilidade de rancificação do azeite indicando que as azeitonas sofreram processos de degradação e/ou fermentação (Iñon *et al.*, 2003). Assim, a acidez não tem qualquer relação com o sabor, mas com fatores que incluem o ataque de pragas e doenças, o contacto prolongado da água com o azeite e as más práticas de colheita, transporte, armazenamento e extração descuidados (Costa, 2012).

Em todas as amostras de azeite analisadas o teor de ácidos gordos livres apresentou valores inferiores a 0,4% de ácido oleico, como se verifica na Figura 3.8, que corresponde à classificação de azeite virgem extra. Para este parâmetro os azeites classificados como virgem extra poderão ter uma acidez máxima de 0,8% enquanto que para os classificados na categoria de azeite virgem o valor limite é 2% (Regulamento CEE 2568/1991, Anexo I).

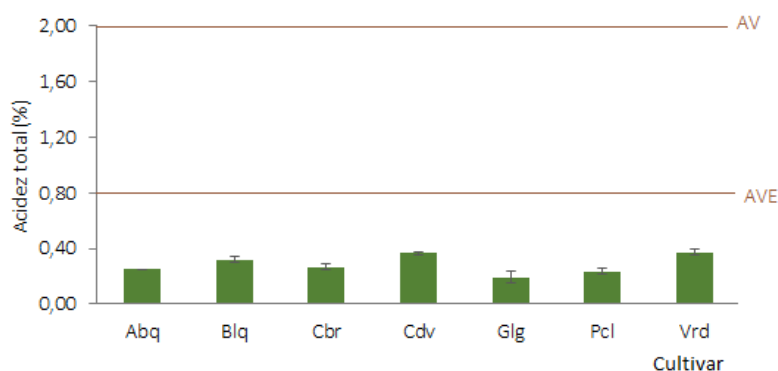


Figura 3.8 – Valores médios e desvio padrão dos ácidos gordos livres obtidos nas diferentes amostras de azeite, expresso em percentagem de ácido oleico (AV= azeite virgem, AVE = azeite virgem extra, Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Quando comparados com vários estudos sobre a utilização de frutos são como matéria prima de qualidade e o seu processamento numa escala pequena (Salvador *et al.*, 2001), os valores obtidos de ácidos gordos livres corroboram na obtenção de azeites com baixos valores de acidez (Pintado *et al.*, 2007).

Na Figura 3.8 observa-se que todos os azeites obtidos apresentam acidez inferior a 0,4%, entre $0,19\% \pm 0,04$ na cv. Galega vulgar e $0,38\% \pm 0,02$ na cv. Verdeal de Serpa. A subida de acidez pode ser justificada pela evolução da maturação da azeitona ou pelo estado sanitário das azeitonas, tal como refere um estudo com azeitonas em estágio de maturação avançado, em que se verificou maior sensibilidade a infeções patogénicas e danos mecânicos que resultam da atividade de enzimas lipolíticas, originando azeites com níveis de acidez mais elevados (Yorulmaz *et al.*, 2013). De igual modo num estudo com amostras de azeitona da variedade Cornicabra em duas regiões de Castilla-La Mancha o teor em ácidos gordos livres progrediu com o amadurecimento (Salvador *et al.*, 2001), nas variedades Blanqueta e Arbequina (García *et al.*, 1996), Picual e Hojiblanca (Gutiérrez *et al.*, 1999) tendo-se verificado um aumento da acidez de 0,10-0,15% com um IM de 2 para 0,2-0,4% com um IM próximo de 5.

Os valores mais elevados obtidos no ensaio corresponderam à cv. Verdeal de Serpa com 0,38% e um IM de 2,25 e à cv. Blanqueta com 0,32% e um IM 2,82, ambos inferiores ao limite superior de 0,8% estabelecido para o melhor azeite de qualidade comercial. Os valores de acidez um pouco mais elevados que as restantes amostras, apesar de inferiores a 0,4%, poderá dever-se ao estado de maturação ou ao estado fitossanitário de algumas azeitonas da amostra que originou uma ligeira subida., tal como referido na bibliografia.

Num estudo comparativo entre modos de produção biológico e integrado na cv. Galega vulgar proveniente da região da Beira Baixa durante a campanha 2004/05 obtiveram-se valores de ácidos gordos livres entre 0,05 e 0,49 para um IM de 3,5 (Pintado *et al.*, 2007), enquanto neste ensaio para um IM de 4,18, ou seja para um estado de maturação da azeitona mais adiantado, obteve-se um azeite com um teor de ácidos gordos livres de $0,19 \pm 0,04$. É possível obter azeite com acidez baixa e um estado de maturação mais avançado com azeitonas isentas de danos mecânicos ou patogénicos.

Assim, Jiménez *et al.* (2013) não encontraram uma tendência evidente para a acidez com a maturação do fruto, no entanto, outros investigadores (Salvador *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2010) observaram um aumento da acidez à medida que a azeitona vai amadurecendo e enquanto ocorre incrementa-se a atividade enzimática, especialmente as enzimas lipolíticas (Salvador *et al.*, 2001), ficando as azeitonas mais sensíveis às infeções patogénicas e danos mecânicos.

Do ponto de vista industrial, quando a seleção de azeitonas sãs não é possível e se verifiquem atrasos no seu processamento, as azeitonas em estágios mais tardios de maturação originam azeites com elevados níveis de acidez, por serem mais sensíveis à infeção patogénica (García *et al.*, 1996). A deterioração da qualidade do azeite deve-se a processos oxidativos e hidrolíticos que ocasiona a exposição ao exterior da polpa aos agentes ambientais (Tamendjari *et al.*, 2009).

3.4 ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Uma das medições do controlo de qualidade do azeite é o índice de peróxidos por ser um indicador do estado primário de oxidação num determinado momento, permitindo avaliar o seu estado de conservação (Martins, 2015). Este parâmetro mede a concentração de produtos de oxidação primária, principalmente os hidroperóxidos por serem compostos instáveis que originam produtos de oxidação secundária, tais como cetonas e aldeídos, responsáveis pelo desenvolvimento de sabores desagradáveis no azeite (Guillen & Cabo, 2002).

Durante a extração e o armazenamento do azeite podem ocorrer processos oxidativos envolvendo a formação de hidroperóxidos por auto-oxidação e por foto-oxidação (Inarejos-García *et al.*, 2010). O sistema de extração do azeite pode interferir no teor de peróxidos segundo Ranalli *et al.* (2003), já que um período prolongado de batimento da massa da azeitona provoca variações consideráveis na acidez, índice de peróxidos e ainda variações mais significativas na concentração de pigmentos, compostos fenólicos e voláteis. Quanto maior for este índice menor será a estabilidade oxidativa do azeite com o consequente efeito prejudicial na sua qualidade (Pizarro *et al.*, 2013). O tipo de material de embalagem utilizado no acondicionamento do azeite interfere também no índice de peróxidos, pois segundo o estudo de Mendez & Falque com embalagens de diferentes materiais expostas a todas as intensidades luminosas as amostras acondicionadas em PVC obtiveram valores de peróxidos mais elevados em relação às amostras

embaladas em recipientes de vidro. Esses resultados são similares a outros estudos que apontam para a provável permeabilidade do material plástico ao oxigénio Mendez & Falque (2007).

Os resultados para o índice de peróxidos foram relativamente baixos, como se pode observar pela Figura 3.9, inferiores ao limite estabelecido pelo Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, anexo I, de 20 meq O₂/kg de azeite para as categorias de azeite virgem extra e virgem e coerentes com a diversa bibliografia consultada.

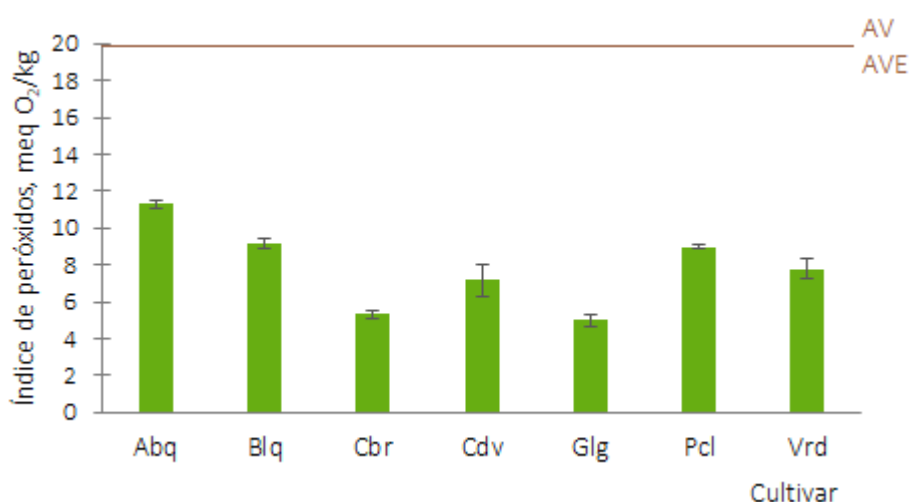


Figura 3.9 – Valores médios e desvio padrão do índice de peróxidos obtidos nas diferentes amostras de azeite, expresso em meq O₂/kg (AV = azeite virgem, AVE = azeite virgem extra, Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Os valores mais elevados de peróxidos foram obtidos para o azeite proveniente da cv. Arbequina com 11 mEq. O₂/kg \pm 0,2, como se observa na Figura 3.9, possivelmente pela sua baixa relação de ácidos gordos monoinsaturados/polinsaturados e baixo conteúdo em polifenóis totais (Gómez *et al.*, 2006), seguindo-se os azeites das cvs. Blanqueta, Picual e Verdeal que se encontram num estado de oxidação ligeiramente menos avançado.

Num estudo com azeite proveniente da cv. Arbequina, obteve-se um índice de peróxidos próximo de 14 meqO₂/kg após dois dias sujeito a temperaturas de 80°C. No entanto, passados quinze dias verificou-se que a sua estabilidade não foi alterada pela temperatura a que foi submetido durante o ensaio devido à carência de oxigénio disponível para iniciar as reações de autoxidação. A nível industrial ao evitar o contacto do azeite com o oxigénio durante o processo

de conservação é possível manter os parâmetros de qualidade entre os limites estabelecidos pela legislação (Gómez *et al.*, 2006). Por comparação com o resultado obtido no ensaio para a cv.Arbequina de $11 \text{ mEqO}_2/\text{kg} \pm 0,2$ desde que as condições de armazenamento sejam adequadas este valor não deverá aumentar segundo o estudo referido, podendo manter a categoria de virgem extra.

Segundo García *et al.* (1996) o baixo teor de ácido oleico e elevado teor de ácido linoleico e linolénico conferem ao azeite da variedade Blanqueta maior suscetibilidade à oxidação o que explicaria um valor elevado do índice de peróxidos. Neste ensaio verificou-se como o segundo conteúdo mais alto a seguir à cv.Arbequina com o resultado de $9,1 \text{ mEqO}_2/\text{kg} \pm 0,3$.

Para Humanes e Civantos (1992) os azeites obtidos a partir da variedade Picual são mais estáveis à oxidação do que os azeites obtidos a partir da variedade Arbequina, tal como observado neste trabalho. No seu estudo Sánchez *et al.* (2006) obteve um índice de peróxidos de $8,65 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ para a cultivar Picual no estado de maturação de mudança de cor muito próximo ao resultado obtido neste ensaio de $8,9 \text{ mEqO}_2/\text{kg} \pm 0,1$.

Por outro lado Gouveia-Martins *et al.* (2001), obtiveram valores de peróxidos mais baixos nos azeites provenientes da cv. Galega vulgar em comparação com outros azeites, tal como observado neste ensaio com um valor de $4,9 \text{ mEqO}_2/\text{kg}$, o que os levou a considerar que a sua estabilidade oxidativa parece estar relacionada com o seu baixo teor em ácidos gordos polinsaturados e, possivelmente também, com o seu teor em tocoferóis. No estudo de Vaz-Freire *et al.* (2007) que compara azeites provenientes de cv. Galega vulgar da região de Elvas obtidos por dois sistemas de extração diferentes, prensas e duas fases, durante quatro campanhas, para um IM médio de 4,6 obteve índices de peróxidos entre 8 e $16 \text{ meqO}_2/\text{kg}$, concluindo que o sistema de extração pode interferir neste parâmetro. O ensaio realizado por Maia com azeite proveniente da cv.Cobrançosa de Castelo Branco com um IM de 4,1 obteve um índice de peróxidos de $6,36 \text{ mEqO}_2/\text{kg}$, valor próximo de $5,3 \text{ mEqO}_2/\text{kg}$ obtido neste trabalho (Maia, 2014). A composição de ácidos gordos monoinsaturados desta variedade na região Alentejo confere-lhe alguma estabilidade oxidativa pela relação AGMI/AGPI de $8,30 \pm 1,3$ (Baer, 2015).

Tal como concluído por Jiménez ao comparar os resultados obtidos para as diferentes amostras e respectivos IM deste trabalho verifica-se que o índice de peróxidos desce durante a maturação Jiménez (2011). Os azeites num estado de maturação superior apresentam índice de

peróxidos mais baixos (Jiménez, 2011) Efectivamente, a cv. Arbequina com IM 1,2 apresenta um índice de peróxidos mais elevado de 11,2 mEqO₂/kg comparado com outras amostras em que as azeitonas se encontram numa fase mais adiantada com valores de IP inferiores. Este aspeto pode também ser explicado pela descida da atividade da enzima lipoxigenase como está descrito por vários autores (Gutiérrez *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 2001; Youssef *et al.*, 2010). A partir de uma determinada fase de maturação segue então uma tendência ascendente que pode ser devido a um estado avançado do fruto que faz que se incremente a oxidação (Jiménez, 2011).

3.5 ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO (k_{232} E k_{270})

A análise espectrofotométrica no ultravioleta de um azeite fornece indicações sobre a sua qualidade e pureza (Civantos, 2008). A absorvância é medida a vários comprimentos de onda a partir dos quais é possível determinar os coeficientes de extinção específicos que indicam o estado de oxidação do azeite, o estado de conservação e/ou alterações como consequência dos processos tecnológicos, sendo obrigatória para as diferentes categorias (Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, Anexo I).

Os valores destas absorvâncias são expressos em termos de extinção específica, convencionalmente designada por K (coeficiente de extinção), em que K_{232} , K_{270} e ΔK , são utilizados para avaliar a autenticidade e a qualidade do azeite. Quando estes valores são baixos estamos perante azeites de boa qualidade (Kiritsakis, 1992; Bouskou, 1998). Quando os valores ultrapassam os limites estabelecidos pela legislação, além de mostrarem uma aceleração no processo de degradação do azeite, podem indicar a presença de azeites de baixa qualidade que sofreram adulterações com componentes adicionados.

O K_{232} indica, da mesma forma que o índice de peróxidos, a oxidação inicial de um azeite (Jiménez, 2011), quantificando a sua absorção de luz numa região ultravioleta num comprimento de onda de 232 nm. O limite máximo para o azeite virgem extra é de 2,5 e para o azeite virgem é de 2,6 (Anexo I do Regulamento (UE) nº1348/2013).

O K_{270} deteta um estado oxidativo mais avançado medindo a absorvância de um azeite ao comprimento de onda de 270 nm. À medida que o processo oxidativo avança, os peróxidos vão-se modificando obtendo-se outro tipo de componentes: alfa-dicetonas ou cetonas alfa insaturadas que absorvem luz ultravioleta a diferentes comprimentos de onda, a 270 nm, do que

os hidroperóxidos (Jiménez, 2011). Num azeite obtido a partir de azeitonas sãs, que não tenham sido submetidas a nenhum tratamento diferente das operações físicas próprias da extração, o seu valor é geralmente inferior aos limites estabelecidos (0,22 para virgem extra e 0,25 para virgem) (Anexo I do Regulamento (UE) nº1348/2013). Um valor elevado de absorvância a 270 nm está relacionado com a oxidação do azeite virgem, com o processo de refinação ou com ambos ao mesmo tempo (Jimenez, 2011).

O ΔK utiliza-se fundamentalmente como critério de pureza, para detetar misturas com azeites refinados. No processo de refinação do azeite, na etapa de descoloração com argilas ativadas, formam-se compostos denominados trienos conjugados, que absorvem também a 270 nm, mas surgem três picos que não existem quando se trata de um azeite virgem (Jiménez, 2011). Para o azeite virgem é aproximadamente a diferença entre o K_{266} e o K_{274} , pelo que $\Delta K=0$, em que o valor máximo permitido é de 0,01 para azeite virgem e virgem extra e 0,16 para azeite refinado. (Anexo I do Regulamento (UE) nº1348/2013).

Dos resultados obtidos representados na Figura 3.10 pode verificar-se que todas as amostras de azeite pertencem à categoria virgem extra por apresentarem valores de K_{232} inferiores a 2,50, em que o valor mais baixo corresponde ao azeite proveniente da cv. Galega vulgar com $0,14\pm 0,1$ e o valor mais elevado ao da cv. Blanqueta com $2,49\pm 0,1$. A cv. Arbequina apresentou valores próximos de $2,0\pm 0,1$, tal como a Verdeal de Serpa, a Cobrançosa e a Cordovil. A cv. Picual apresenta um valor intermédio de $1,51\pm 0,1$.

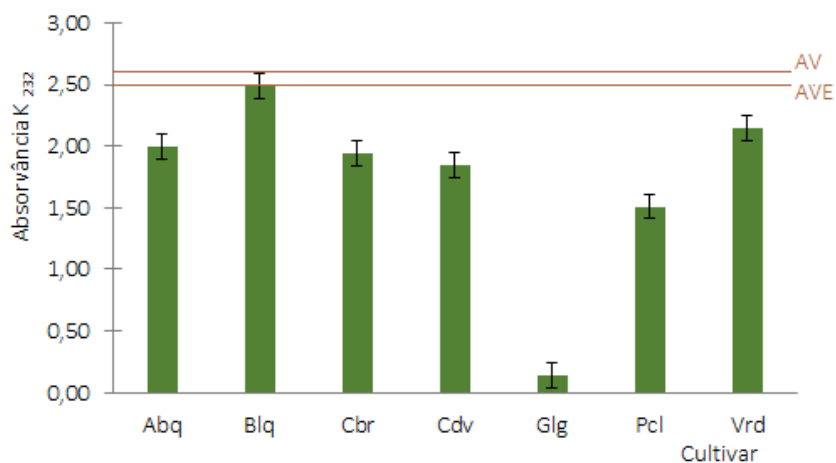


Figura 3.10 – Valores médios e desvio padrão da absorvância K_{232} obtidos nas diferentes amostras de azeite (AV= azeite virgem; AVE = azeite virgem extra, Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa).

Em geral, os azeites obtidos de azeitonas em estágios mais avançados de maturação mostraram um aumento no teor de ácidos gordos conjugados medido pelo K_{232} . Pelo que através destes parâmetros (K_{232} , K_{270}), García *et al.* (1996) consideraram que à medida que a maturação dos frutos progride ocorre uma progressiva deterioração na sua qualidade. No azeite proveniente da cv. Blanqueta obtiveram um K_{232} de 2,20, valor elevado quando comparado com as restantes amostras estudadas em que o valor médio obtido foi 1,80 e o valor limite para a categoria virgem extra é 2,50. Estes investigadores sugerem que as azeitonas desta variedade devem ser laboradas antes que atinjam uma elevada percentagem de frutos maduros. Os resultados da Figura 3.10 assim o confirmam, pois a cv. Blanqueta obteve o maior valor apesar do IM de 2,82 não ter sido muito elevado, tal como para as restantes amostras de azeite. No entanto, com um IM superior de 4,18, o azeite obtido da cv. Galega vulgar apresentou o valor mais baixo de K_{232} .

Na avaliação do K_{270} , representada na Figura 3.11, que está relacionado com a presença de produtos secundários, os valores obtidos foram inferiores ao limite estabelecido pelo Regulamento (CEE) nº 1348/13 para azeite virgem extra e azeite virgem. As cvs. Blanqueta, Cobrançosa e Verdeal de Serpa apresentaram os valores limites para este parâmetro. De acordo com o estudo de Jiménez (2011) a absorção a 270 nm (K_{270}), na mesma variedade e entre variedades diferentes, comporta-se de modo semelhante ao índice de peróxidos; diminui à medida que avança o estado de maturação, tal como verificado neste trabalho.

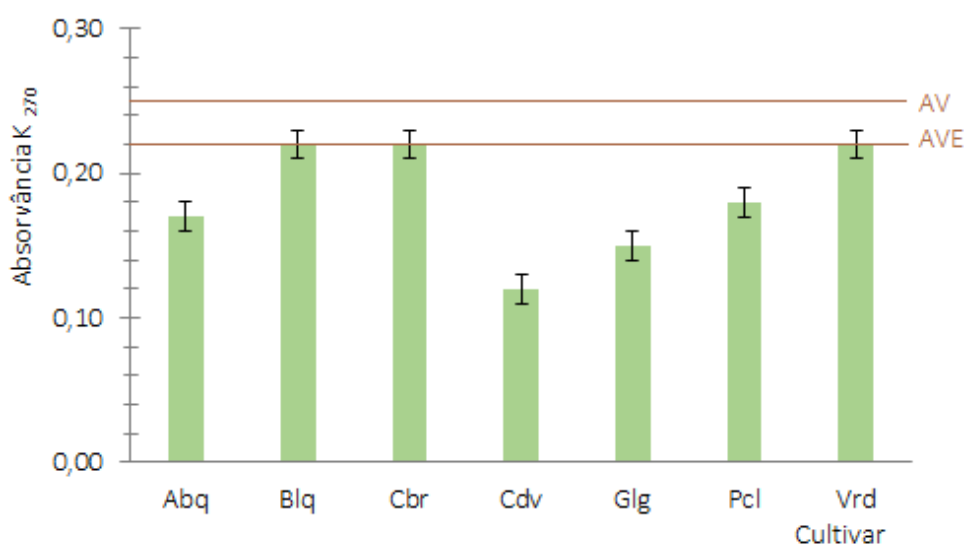


Figura 3.11 – Valores médios e desvio padrão da absorvância K_{270} obtidos nas diferentes amostras de azeite (AV= azeite virgem; AVE = azeite virgem extra, Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Os valores obtidos de ΔK coincidem todos com o limite de 0,01 com exceção do azeite da cv. Cordovil (Figura 3.12), e estão de acordo com o limite estabelecido pelo Regulamento (CEE) nº 1348/13 pertencendo à classificação de azeite virgem extra ou azeite virgem, o que significa que não apresentam qualquer mistura com azeite refinado (Jiménez, 2011).

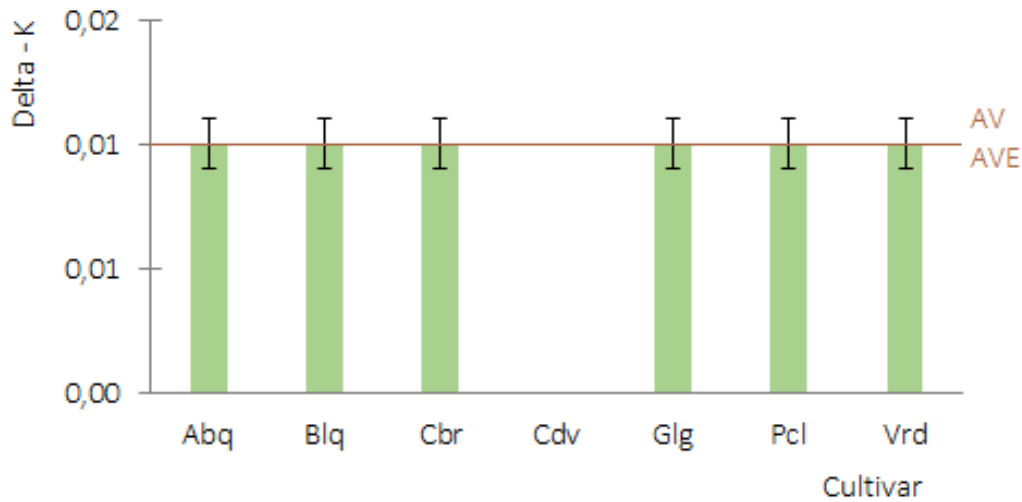


Figura 3.12 – Valores médios e desvio padrão do ΔK obtidos nas diferentes amostras de azeite (AV = azeite virgem, AVE = azeite virgem extra, Abq=Arbequina, Blq=Blanqueta, Cbr= Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

No estudo comparativo entre azeites provenientes de azeitonas sãs e azeitonas picadas pela mosca da azeitona de diferentes cultivares, Pereira *et al.* (2004) verificou que o azeite proveniente de azeitonas sãs da cv. Cobrançosa, colhidas em meados de dezembro na região Nordeste de Portugal, obtiveram valores de K_{232} e K_{270} , muito próximos dos limites legais para a categoria virgem extra.

No mesmo estudo de García *et al.* (1996) as alterações nos teores de carbonilo dos azeites provenientes de azeitonas em estágios mais avançados de maturação, medidos pelo seu K_{270} , diferiram de acordo com a variedade, seguindo perfis distintos tal como neste trabalho. Nesse estudo os azeites da cv. Arbequina apresentaram valores crescentes à medida que a maturação evoluiu apresentando o menor valor de K_{270} no estado verde (0,10) e o maior valor (0,17) no estado maduro, sendo este valor significativamente maior que os observados pelos azeites extraídos de outras variedades no mesmo estado de maturação (García *et al.*, 1996), tal como se observou neste trabalho para a mesma variedade e num estágio inicial de maturação em que o

K₂₇₀ foi mais elevado relativamente a outras variedades com estados de maturação mais adiantados. Pelo contrário, o azeite da cv. Blanqueta no estágio verde deu origem a azeites com maior teor de carbonilos (aldeídos e cetonas) do que o azeite obtido de frutos maduros em que o valor desceu 30% do valor inicial.

O estudo sobre a composição dos ácidos gordos em seis variedades diferentes, Picual, Galega, Cordovil, Blanqueta, Arbequina e Cobrançosa, na região Alentejo durante três campanhas, confirmou a presença destes ácidos gordos insaturados em maior percentagem nas cvs Blanqueta, Cordovil, Cobrançosa e Cordovil. Para o ácido gordo insaturado linoleico (C18:2) obteve uma composição percentual de 14,94±2,86 para a cv. Blanqueta que se destacou das restantes, seguida da Arbequina com 9,69 ±1,24 e Cobrançosa 8,05±2,14, destacando-se para o ácido linolénico (C18:3) também a cv. Blanqueta com 1,07±0,35 seguida das cvs. Cobrançosa com 0,77±0,4 e Cordovil com 0,77±0,01, entre as restantes variedades Picual e Galega. Guillén & Cabo (2002) relacionaram o aumento do valor dos coeficientes específicos com o teor de ácidos gordos insaturados especialmente o ácido linoleico (C18: 2) e o ácido linolénico (C18: 3) (Baer, 2015). A isomerização destes ácidos pode dar origem a ligações duplas conjugadas de dieno ou trieno provenientes de unidades 1,4-pentadieno ou de 1,4,7 octatrieno presentes nos ácidos linoleico ou linolénico, respectivamente, alterando a estabilidade do azeite (Guillén&Cabo (2002)., para as cvs.Arbequina, Blanqueta, Cobrançosa e Cordovil que se destacam das restantes cultivares pelos coeficientes específicos mais elevados.

3.6 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O azeite virgem é praticamente a única gordura que contém importantes quantidades de antioxidantes naturais, fenóis e tocoferóis, que pela sua importância nutricional implicam efeitos benéficos na saúde humana. Para além de contribuírem para o aroma característico como o amargo, os fenóis são em grande parte responsáveis pela estabilidade oxidativa do azeite (Mansouri *et al.*, 2013), sendo uma das bases para o aumento de vida de prateleira do produto. O conteúdo em compostos fenólicos no azeite virgem é um fator importante quando se avalia a sua qualidade pois a presença de antioxidantes naturais modifica notavelmente a resistência que este pode oferecer à autooxidação.

O teor de compostos fenólicos no azeite virgem pode oscilar entre 50 e 1000 mg/L (Alowaiesh *et al.*, 2018; Aguilera *et al.*, 2005), dependendo de vários fatores como a cultivar, o

clima, o solo, a localização do olival, o estado de maturação dos frutos, o sistema de produção, o tipo de moenda e os processos de extração (Aguilera *et al.*, 2005; Dabbou *et al.*, 2015; El Sohaimy *et al.*, 2016). Os altos níveis de compostos fenólicos observados nas amostras de azeitona estão relacionados com o conteúdo de oleuropeína, o composto fenólico mais ativo em azeitonas (Hermoso *et al.*, 1991; Malick & Bradford, 2006), que é encontrado em maiores percentagens em azeitonas não maduras e diminui durante a maturação.

Para as diferentes amostras de azeite os fenóis totais mostraram diferenças significativas entre as variedades em estudo, como se verifica na Figura 3.13. Os resultados são apresentados também em mg de equivalente de ácido cafeico/kg (mg EAC/kg) (Figura 3.14) para podermos comparar com a bibliografia consultada. O intervalo de valores oscilou entre 27 ± 3 e 262 ± 49 mg EAG/kg (29 e 277 mg EAC/kg), correspondendo o valor mais baixo à cv. Arbequina e o valor mais elevado à cv. Verdeal de Serpa. Para as restantes cultivares obtiveram-se valores intermédios, 230 ± 11 mg EAG/kg (244 ± 12 mg EAC/kg) para a Blanqueta, 210 ± 49 mg EAG/kg (221 ± 52 mg EAC/kg) para a Cobrançosa, 122 ± 30 mg EAG/kg (129 ± 32 mg EAC/kg) para a Cordovil, 38 ± 10 mg EAG/kg (40 ± 11 mg EAC/kg) para a Galega vulgar e 156 ± 10 mg EAG/kg (166 ± 10 mg/EAC/kg) para a Picual.

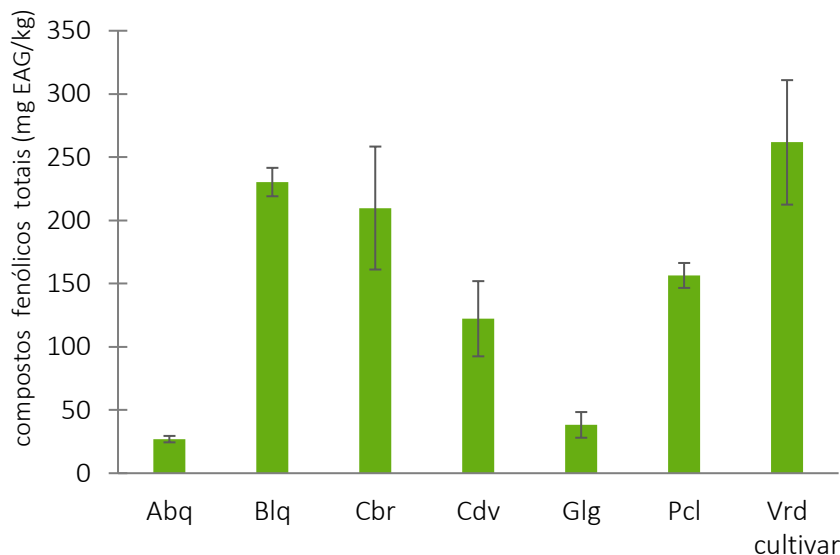


Figura 3.13 – Valores médios e desvio padrão dos compostos fenólicos totais, em mg de ácido gálico por kg, nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

De acordo com vários autores a influência varietal interfere no conteúdo dos fenóis totais (Gouveia *et al.*, 2003; Henriques *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2003) e possibilitam a caracterização dos

diferentes azeites monovarietais (Mansouri *et al.*, 2014). Os valores médios obtidos de fenóis totais apresentam uma variabilidade elevada entre as diferentes variedades tal como verificado por Gutiérrez *et al.* (2001).

O valor médio de fenóis totais obtido para a cv. Galega vulgar foi de 38 mg EAG/kg, valor semelhante a 40 mg EAG/kg obtido por Peres *et al.* (2003), que considera os valores baixos de fenóis sendo uma característica desta variedade (Peres *et al.*, 2003).

Tal como o valor médio de 166 mg EAC/kg para a cv. Picual, valor próximo de 191,92 mg EAC/kg obtido por Aparício *et al.* (1999), em concordância com vários autores que relacionam esta variedade com valores elevados de compostos fenólicos (Aparício *et al.*, 1999; Peres *et al.*, 2003). Quanto ao teor de fenóis totais da cv. Cobrançosa obteve-se 221 ± 52 mg EAC/kg, valor semelhante aos 203 mg EAC/kg obtido por Matos *et al.* (2007).

A elevada presença de compostos fenólicos poderia utilizar-se para definir o grau de maturação ideal para conferir um bom equilíbrio entre os perfis químicos do azeite virgem e aumentar a sua vida útil (Mansouri *et al.*, 2014). Além disso, é interessante assinalar que neste trabalho a cv. Verdeal de Serpa, pelos valores elevados de fenóis totais que apresenta, poderia ser utilizada para melhorar a vida útil de lotes de azeites procedentes de outras variedades menos estáveis.

Uma das principais causas da perda de qualidade durante o armazenamento do azeite virgem é a degradação oxidativa, na qual o papel dos compostos fenólicos é de grande importância (Bendini *et al.*, 2007). Assim, o aumento de antioxidantes naturais pressupõe uma estratégia potencial para reduzir os efeitos prejudiciais que causa o armazenamento do azeite a longo prazo, pela sua consequente deterioração.

No estudo comparativo de azeites monovarietais, Peres *et al.* (2009) a partir de azeitonas da cv. Galega Vulgar com IM próximo de 5, provenientes de um olival de seis anos localizado na região da Beira Baixa DOP, durante três campanhas consecutivas de 2004 a 2006, obtiveram azeites com baixos valores de fenóis próximos de 100 e 60 mg/kg em outubro e novembro, respetivamente, quando comparados com outras variedades. Uma menor quantidade de antioxidantes fenólicos para colheitas mais tardias indica que não há qualquer vantagem em protelar a época de colheita da azeitona, a partir do momento em que a biossíntese de toda a

gordura foi atingida (Peres *et al.*, 2009), como é o caso da cv. Galega vulgar que neste trabalho apresentava o IM mais elevado de 4,18 e um teor de fenóis baixo, podendo o estado de maturação influenciar este valor além do factor genético.

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da capacidade oxidante do azeite foi medida pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Este método é muito utilizado para avaliar o potencial antioxidante, mais especificamente, a atividade sequestradora do radical de DPPH do azeite, expressa em mg de equivalente de ácido ascórbico/kg de azeite (mg EAA/kg).

A figura 3.14 mostra-nos as alterações da atividade antioxidante dos extratos fenólicos do azeite, analisados pelo teste de DPPH ao fim de 20 minutos de reação e apresentaram valores entre $0,43\pm 0,05$ e $0,87\pm 0,28$ mg de equivalentes de ácido ascórbico por Kg. Através dos resultados obtidos podemos verificar que, ao fim do mesmo tempo de reação, as amostras que possuem um maior poder antioxidante correspondem à cv. Blanqueta com $0,87\pm 0,28$ mg EAA/kg e Cordovil com $0,82\pm 0,24$ mg EAA/kg, visto que são aquelas que reagem mais rapidamente com o radical sintético.

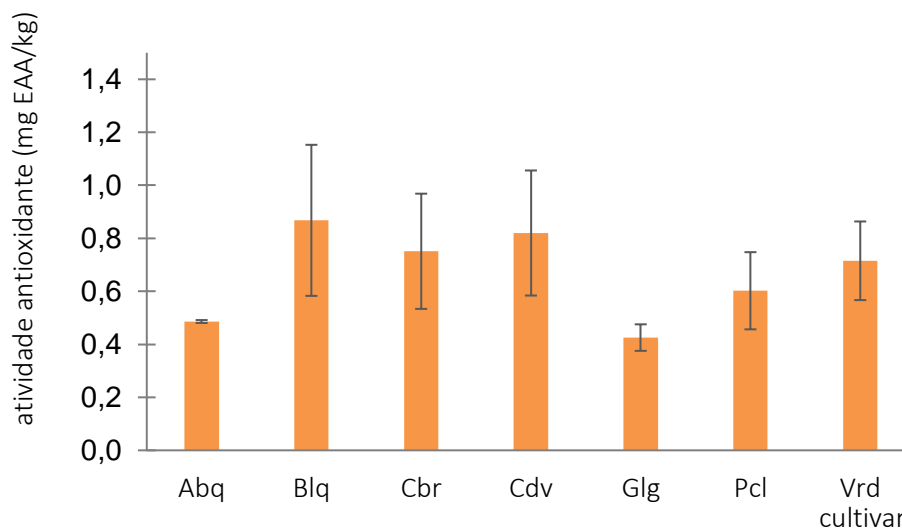


Figura 3.14 – Valores médios e desvio padrão da atividade antioxidante, em mg de equivalentes de ácido ascórbico por kg, nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Os azeites obtidos a partir das cvs. Galega vulgar com $0,43 \pm 0,05$ mg EAA/kg e Arbequina $0,49 \pm 0,01$ mg EAA/kg apresentaram menor atividade antioxidante, enquanto que os valores mais elevados foram obtidos nas cvs. Blanqueta com $0,87 \pm 0,28$ mg EAA/kg, Cordovil com $0,82 \pm 0,24$ mg EAA/kg. Os resultados intermédios foram observados na cv. Cobrançosa com $0,75 \pm 0,22$ mg EAA/kg, na cv. Picual com $0,60 \pm 0,15$ mg EAA/kg e na cv. Verdeal de Serpa com $0,72 \pm 0,15$ mg EAA/kg.

A correlação entre o conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante tem sido amplamente difundida em diferentes géneros alimentícios, como frutas e hortaliças, vinho, plantas, sementes (Kedage *et al.*, 2007) e azeite (Ubando-Rivera *et al.*, 2005; Del Carlo *et al.*, 2004), que demonstraram que uma alta concentração do teor de fenóis totais implica que a capacidade antioxidante desse alimento aumente significativamente devido à sua capacidade de bloquear os radicais livres (Gorinstein *et al.*, 2003; Morelló *et al.*, 2005). No estudo que envolveu a análise de azeites obtidos de sete variedades de azeitonas representativas da região sudoeste espanhola (Arbequina, Carrasquenha, Corniche, Manzanilla Cacereña, Morisca, Picual e Verdial de Badajoz), Franco e seus colaboradores encontraram uma boa correlação entre a capacidade antioxidante, o conteúdo fenólico total e a estabilidade oxidativa ao longo da maturação, indicando que a capacidade antioxidante é influenciada principalmente pela quantidade de compostos fenólicos que contribuem para a inibição da ação lipídica (Franco *et al.*, 2014).

Nesse sentido verifica-se que as amostras das cvs. Blanqueta e Verdeal de Serpa apresentam um bom poder antioxidante, talvez pelo facto de possuir uma quantidade considerável de polifenóis, com exceção da cv. Cordovil que apesar do teor de fenóis ser elevado a atividade antioxidante foi mais reduzida, talvez porque os tipos de fenóis não possuam atividade antioxidante.

3.8 ÍNDICE ESPECTROFOTOMÉTRICO K_{225}

O sabor amargo é um dos atributos positivos característicos do azeite virgem (COI, 2017), que está associado, tal como a adstringência e o frutado, a elevados teores em compostos fenólicos os quais decrescem fortemente ao longo da maturação (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1992). O índice de amargo do azeite diminuiu à medida que a maturação das azeitonas progride. (García *et al.*, 1996). Gutiérrez e seus colaboradores também identificaram uma elevada correlação com as azeitonas no estado de maturação verde e na mudança de cor, enquanto que no maduro a

correlação não foi tão alta. Além disso, os valores de K_{225} diminuíram de verde à mudança de cor e posteriormente mantiveram-se constantes ou com leve diminuição até ao estado maduro (Gutiérrez *et al.*, 1992).

A intensidade do amargo interfere no consumo do produto e varia entre os diferentes azeites; enquanto uma ligeira intensidade é agradável, uma intensidade mais forte reduz as características organoléticas do azeite e, conseqüentemente a sua qualidade, o que pode originar a rejeição por parte do consumidor, causando dificuldades no seu escoamento (Beltran *et al.*, 1995). Apesar do sabor amargo ser avaliado em análise sensorial, o treino e a manutenção de um painel de provadores é trabalhoso e demorado, pelo que têm sido implementados métodos instrumentais alternativos (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1992).

Ao estar relacionado com o conteúdo em polifenóis (Beltran *et al.*, 1995), é possível determinar a intensidade do sabor amargo por um método desenvolvido por Gutiérrez *et al.* (1992) baseado na extração dos constituintes amargos com metanol e a medição do coeficiente de extinção específico a 225 nm. Este método demonstra uma correlação significativa com a intensidade do amargo avaliada sensorialmente por um painel de provadores, sendo uma alternativa objetiva para a avaliação deste atributo.

Os resultados obtidos para as diferentes amostras de azeite, como se observa na Figura 3.15, demonstram que o valor de K_{225} mais elevado se verificou para o azeite obtido da cv. Verdeal de Serpa com $0,45 \pm 0,05$ e IM de $2,25 \pm 0,22$, seguido da cv. Blanqueta com um valor de $0,34 \pm 0,06$ e IM $2,82 \pm 0,23$, sendo o amargo uma característica das variedades apesar de diminuir ao longo da maturação dos frutos como verificado por vários autores (Garcia *et al.*, 1996 ; Peres *et al.*, 2003). No entanto, a cv. Arbequina com um IM de $1,01 \pm 0,09$ resultou no K_{225} mais baixo, de acordo com vários autores (García *et al.*, 1996; Chimi *et al.*, 1988; Conceição *et al.*, 2003), em que esta variedade se comporta de forma diferente pois o K_{225} manteve-se sempre baixo ao longo da maturação correspondendo os valores mais elevados às cvs. Blanqueta e Verdeal (Garcia *et al.*, 1996).

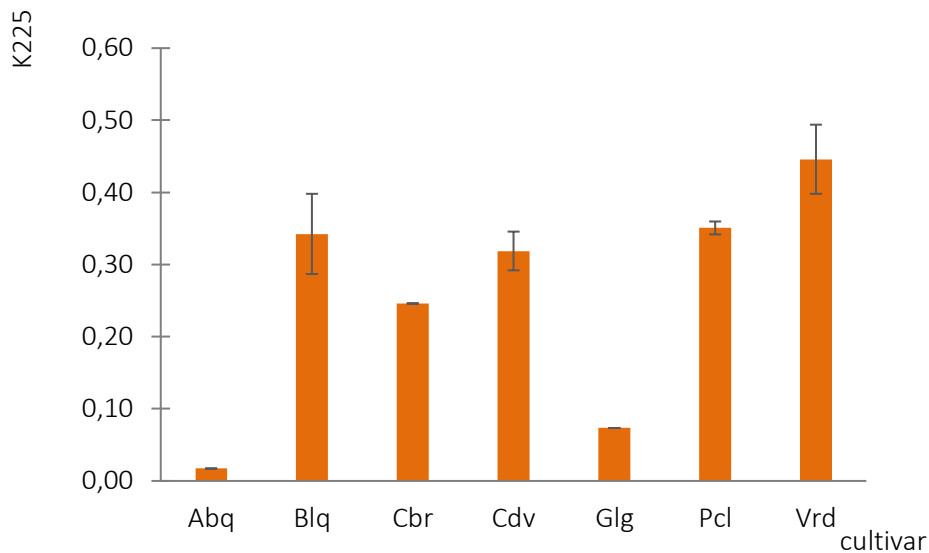


Figura 3.15 – Valores médios e desvio padrão do índice espetofotométrico K_{225} nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Apesar do IM ser baixo o amargo não é característico da variedade Arbequina não sendo influenciado pela maturação dos frutos, ao inverso das restantes variedades em análise como se observa na Figura 3.16.

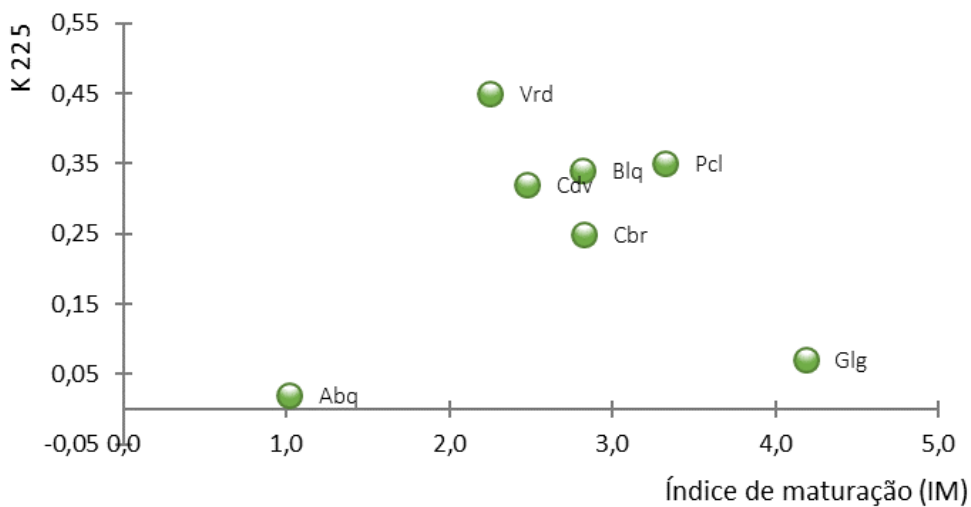


Figura 3.16 – Relação entre o K_{225} e o Índice de maturação (IM) (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

Os resultados do índice de amargo podem relacionar-se com a estabilidade à oxidação dos azeites, por estarem relacionados com o teor de polifenóis que atuam como antioxidantes naturais no azeite (Chimi *et al.*, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1992). Do ponto de vista comercial, o loteamento de azeite obtido da cv. Verdeal de Serpa com K_{225} elevado, e outros azeites de baixo índice de amargo, como o obtido na cv. Arbequina, evitaria o problema do amargo excessivo e contribuiria para aumentar a estabilidade do lote de azeite.

Para os azeites obtidos da cv. Arbequina que mostraram um nível muito baixo de amargo, uma colheita tardia não representa qualquer vantagem para esta variedade (García *et al.*, 1996).

Do seu estudo Gutiérrez *et al.* (1992) depreenderam que um valor de K_{225} menor ou igual a 0,140 corresponde a azeites com intensidade de amargo inferior a 1, considerados azeites não amargos ou quase impercetivelmente amargos. Quando a intensidade do amargo aumenta, podem surgir problemas no seu consumo direto. Embora não exista um limite claro ou estabelecido, a sua experiência tem mostrado que tais problemas começam a surgir quando a intensidade excede 2,5; um valor K_{225} de 0,250 pode servir como um ponto de referência. Valores de K_{225} superiores a 0,360 correspondem a azeites muito amargos, intensidades altas ou extremamente altas, que são rejeitados por muitos consumidores. Pelo que o azeite proveniente da cv. Arbequina e da cv. Galega são considerados azeite de índice 1, não amargos ou impercetivelmente amargos, como verificado por Pinheiro-Alves (2002). O azeite proveniente das cvs. Blanqueta, Picual e Verdeal de Serpa são considerados azeites de índice 2,5, muito amargos, sendo este último o mais amargo sendo preteridos pela maioria dos consumidores como verificado por Gutiérrez-Rosales *et al.* (1992). O resultado da cv. Cordovil obteve um valor semelhante à Blanqueta e Picual.

Tal como este estudo Pinheiro-Alves (2002) confirmou que o azeite da cv. Galega vulgar possui menor intensidade de sabor amargo (K_{225}) comparativamente com o da cv. Cobrançosa,

O amargo do azeite virgem foi atribuído ao elevado teor em glucósido secoiridóide, composto fenólico lipofílico altamente amargo, solúvel em água, característico das *Oleaceae*, denominado oleuropeína (Bourquelot e Vintilesco, 1908; García *et al.*, 2005), que se forma de glucose, ácido elenólico e o-difenol hidroxitirosol. A concentração deste glucósido nos frutos depende de muitos fatores como a variedade, o sistema de rega e o estado de maturação da azeitona. García *et al.* (2005) verificaram que um tratamento térmico, previamente aplicado ao

fruto, pode alterar as atividades das enzimas durante o processo de extração do azeite. Estas enzimas, como as glicosidases e esterases, estão envolvidas na hidrólise do glucósido. Provavelmente, inibindo essas atividades enzimáticas, parcial ou totalmente, o tratamento térmico atinge uma diminuição no teor de compostos amargos do azeite. No entanto, este tratamento é difícil de adaptar às linhas de produção da indústria de extração de azeite.

3.9 FLAVONÓIDES TOTAIS

Dos compostos fenólicos, o grupo dos flavonóides é o mais extenso na natureza e são os que possuem uma maior atividade antioxidante. Segundo Neveu *et al.* (2010) são uma das quatro classes principais de polifenóis presentes nos alimentos. Visioli *et al.* (2000) consideraram que os flavonóides são excelentes antioxidantes comparáveis à vitamina E e que podem mimetizar o efeito do α -tocoferol ao romper a cadeia de radicais livres nas membranas microssomais hepáticas. Estudos epidemiológicos demonstraram que uma ingestão rica em flavonóides está correlacionada com um menor risco de doenças cardiovasculares (Creus, 2004). Através de métodos cromatográficos foi possível demonstrar a presença de alguns destes compostos em folhas de oliveira, azeitonas e azeite (Brenes *et al.*, 1999).

Todos os azeites analisados apresentaram consideráveis teores em flavonóides como se observa na Figura 3.17, com uma variação entre 31 ± 5 e 62 ± 17 mg de catequina/kg para a cv. Blanqueta e a cv. Verdeal de Serpa, respetivamente.

Para o azeite de Arbequina e de Verdeal de Serpa que se apresentam no primeiro estado de maturação com IM 1,02 e 2,25 respetivamente (Figura 3.3) os valores de flavonóides são superiores quando comparados com as restantes cultivares que apresentam estados de maturação mais avançados. Estes resultados apresentam-se concordantes com a literatura (Gouvinhas *et al.*, 2015; Nieto *et al.*, 2010) que descrevem os teores em flavonóides mais elevados para os primeiros estados de maturação.

Para o azeite Picual os valores de flavonóides decrescem entre o primeiro estado de maturação e o último, azeitona verde e madura (Gouvinhas *et al.*, 2015), que se verifica ao apresentar um IM mais elevado. O mesmo se verifica nos azeites Blanqueta, Cobrançosa, Cordovil e Galega, IM mais elevados possuem valores de flavonóides mais reduzidos.

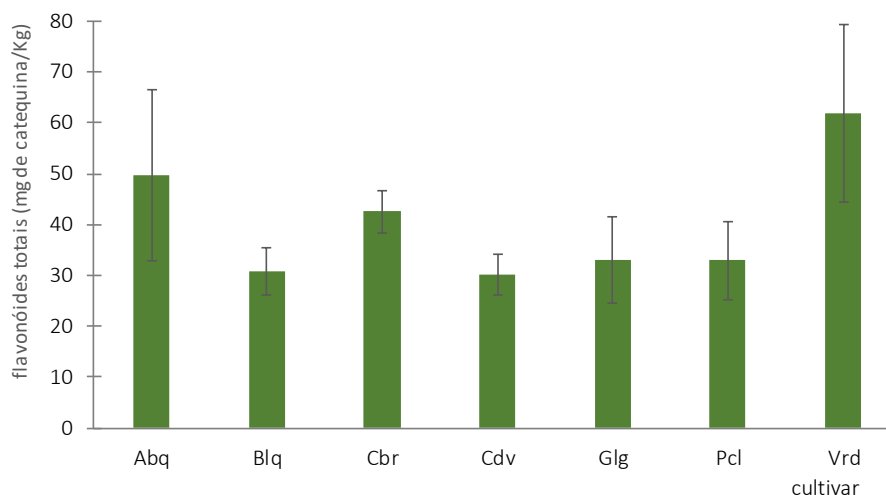


Figura 3.17 – Valores médios e desvio padrão do teor de flavonóides totais nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa) expresso em mg de catequina por kg de azeite

Os resultados obtidos asseguram a importância da época de colheita e consequentemente do estado de maturação da azeitona como fatores que influenciam as características químicas do azeite, assim como a sua potencial atividade nutracêutica.

3.10 COR

3.10.1 PIGMENTOS (CAROTENÓIDES E CLOROFILA)

Os valores médios de clorofilas totais obtidos nas amostras de azeite estudadas (Figura 3.19) variaram entre os $0,91 \pm 0,01$ mg/kg para a cv. Galega vulgar com um IM de 4,18 e $9,04 \pm 0,08$ mg/kg para a cv. Cobrançosa com um IM de 2,83, inferiores aos encontrados por Psomiadou & Tsimidou (2002) entre 9,10 a 23,0 mg/kg e por Boskou (1998) entre 1 e 20 ppm. A concentração de clorofilas obtidas nas amostras provenientes da cv. Arbequina de $4,74 \pm 0,02$ mg/kg no início da maturação com um IM de 1,02 foram inferiores quando comparadas com os resultados de Motilva *et al.* (1998) que obteve 15 mg/kg no início da campanha e 6 mg/kg no final da campanha para a mesma cultivar na região de Lleida.

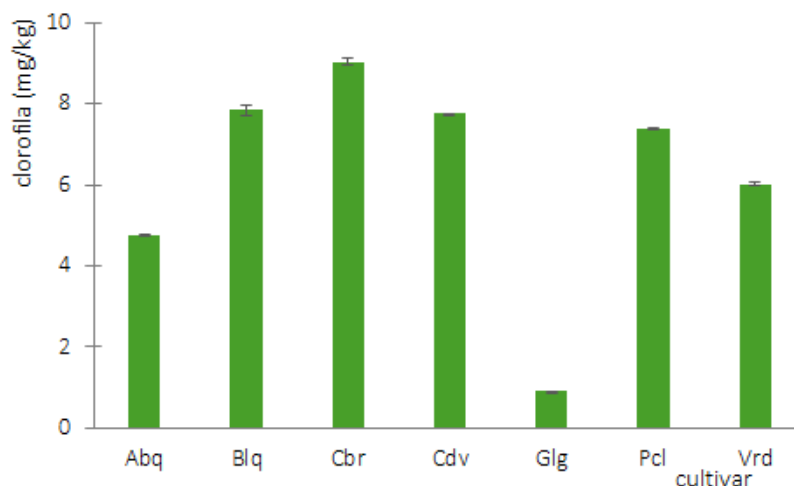


Figura 3.18 – Valores médios e desvio padrão do teor de clorofilas nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa) expresso em mg por kg de azeite

O conteúdo de pigmentos e o seu grau de extinção durante a maturação do fruto é uma característica de cada variedade, o que implica que o catabolismo desses pigmentos ocorre em proporções inerentes a cada variedade (Roca & Mínguez-Mosquera, 2001).

Na literatura, um intervalo de valores do IM entre 2 e 4 é descrito como o estado de maturação em que ocorre uma redução contínua na quantidade de pigmentos (clorofila e carotenóides) (Matos *et al.*, 2007). Sendo a maturação um dos fatores que pode influenciar o teor de pigmentos no azeite, considerando os valores do IM referidos, os azeites em análise coincidem com este intervalo pelo que os teores de pigmentos estão a decrescer, com exceção da cv. Arbequina que apresenta um IM inferior a 2.

A concentração de clorofilas depende do grau de maturação das azeitonas. No início do período de colheita predominam as clorofilas, diminuindo no final desta. A descida da concentração de clorofilas pode ser justificada pela atuação de várias enzimas de degradação presentes na azeitona. À medida que a maturação avança a perda de clorofilas provoca uma diminuição na cor verde da azeitona e conseqüentemente na cor do azeite, em função das quantidades e proporções de outros pigmentos, principalmente compostos de degradação (Minguez *et al.*, 1990). Matos e colaboradores (2007) também concluíram que o teor de pigmentos decresce com o índice de maturação dos frutos, tendo obtido valores de clorofilas totais de 25 mg/kg a 30 mg/kg em estágios de maturação iniciais até 2 mg/kg a 5 mg/kg em estágios mais avançados. Relacionando os valores obtidos podemos referir que a cv. Galega se

encontra num estágio de maturação avançado com $0,91 \pm 0,01$ mg/kg, e as restantes variedades em estágios intermédios.

A estabilidade oxidativa do azeite é fortemente afetada pela presença de clorofilas e derivados, uma vez que estes pigmentos são fotossintetizantes em presença da luz (Morales & Przybylski, 2003). O baixo valor de 0,15 do K_{270} (Figura 3.11) na cv. Galega vulgar poderia ser consequência do menor teor de clorofilas que induzem a fotoxidação em presença da luz (Motilva, 1998). Tendo em conta estas considerações o azeite da cv. Galega vulgar seria o mais estável dos azeites em análise com um teor de clorofilas de $0,91 \pm 0,01$ mg/kg e o menos estável o azeite da cv. Cobrançosa com $9,04 \pm 0,08$ mg/kg.

Os principais carotenóides presentes no azeite são a luteína, o β -caroteno, a violaxantina e a neoxantina (Boskou, 1998). Normalmente, o conteúdo total de carotenóides varia entre 1 e 20 ppm (Boskou, 1998).

O teor de carotenóides nas amostras de azeite (Figura 3.19) variou de $0,72 \pm 0,01$ mg/kg para a cv. Galega vulgar com um IM de 4,18 e $4,20 \pm 0,09$ mg/kg para a cv. Blanqueta com um IM de 2,82. O valor médio obtido para a cv. Arbequina foi dos mais baixos, 2,51 mg/kg no início da maturação, IM de 1,02, valor inferior quando comparado com os resultados de Motilva e colaboradores, que verificaram que o teor de carotenóides passou de 12,6 para 4,6 mg/kg de azeite no final da campanha na região de Lleida (Motilva *et al.*, 1998) concluindo que a concentração de carotenóides se reduz ao longo do estado de maturação, tal como as clorofilas.

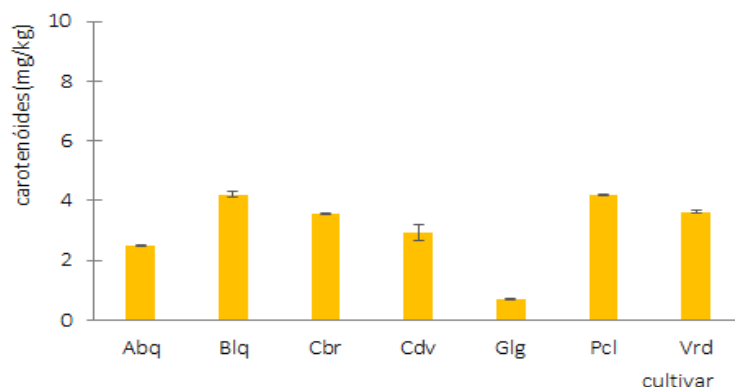


Figura 3.19 – Valores médios e desvio padrão do teor de carotenóides nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa) expresso em mg por kg de azeite

A amostra de azeite que apresentou um maior teor de carotenóides totais foi a proveniente da cv. Blanqueta com valores de $4,20 \pm 0,09$ mg/kg e a que apresentou os menores valores foi a cv. Galega vulgar com teores de $0,72 \pm 0,01$ mg/kg.

Devido aos índices solares da região do Alentejo, as plantas produzem uma maior concentração de compostos de proteção, os quais normalmente são compostos de cor (clorofilas e carotenos) sintetizados pelas plantas em situação de stress luminoso e servem como proteção da radiação ultravioleta para as componentes essenciais das suas células, principalmente o DNA (que sofre mutações em presença de radiação UV) (Oliveira, 2014).

A análise dos pigmentos, clorofilas totais e carotenóides, permitiu um maior esclarecimento sobre o teor de compostos de cor presentes nas diferentes amostras de azeite, bem como a sua relação com a intensidade de cor, o qual se encontra desenvolvido a seguir.

3.10.2 ESCALA CIELAB

A medição da cor foi determinada através de um colorímetro, aparelho que deteta a cor perceptível pelo olho humano, reportando-a em parâmetros quantitativos, através do sistema tridimensional da escala CIEL*a*b*. Neste sistema, L^* representa a luminosidade e indica a coordenada não cromática desde 0 (preto) até 100 (branco), a^* representa a coordenada horizontal que indica a variação da gama de cores desde -80 (verde) até 80 (vermelha) e b^* que representa a coordenada vertical que indica a variação da gama de cores desde -80 (azul) até +80 (amarelo). Através dos valores de a^* e b^* é possível descrever a localização precisa da cor num espaço tridimensional pelo valor do Ângulo de Hue (Moyano *et al.*, 2008).

A cor, com base nas coordenadas CIE-L*a*b*, não apresenta grandes diferenças entre as amostras (Figura 3.20). O parâmetro a^* apresenta valores negativos que se enquadram nos tons verdes, no entanto a diferença entre eles é tão pequena que não tem implicações na apreciação da cor do azeite podendo ser consequência do início da maturação da azeitona. Em relação à coordenada b^* todos os valores médios estão situados na zona dos amarelos. Curiosamente observa-se uma certa tendência para valores negativos de a^* (zona verde) e de b^* (zona do azul) mas mantêm sempre os valores positivos dentro da zona amarela, nos azeites com valores mais baixos de pigmentos (clorofila e carotenóides), observado nas cvs. Galega vulgar e Arbequina. A

coordenada L* não apresenta diferenças entre os azeites, as médias mantêm-se dentro de um intervalo de valores limitado e não muito amplo, compreendido entre $76,2 \pm 0,02$ e $87,0 \pm 0,13$.

Através das coordenadas a* e b* obteve-se o Ângulo Hue que define a tonalidade de cor, com valores médios semelhantes entre os $178,70$ a $178,76 \pm 0,01$, na zona da cor verde. De acordo com os resultados o azeite da cv. Picual é o que apresenta uma tonalidade mais verde e o da cv. Galega vulgar o menos verde; sendo o mais claro o da cv. Arbequina seguido da cv. Galega vulgar e o que apresenta tonalidade mais escura o da cv. Blanqueta; a tonalidade mais amarela corresponde ao da cv. Blanqueta e o menos a cv. Galega vulgar.

Os resultados encontram-se de acordo com o esperado, visto que os azeites da região Alentejo possuem uma coloração escura que varia entre o verde e o amarelo, consoante o estado de maturação e a variedade da azeitona.

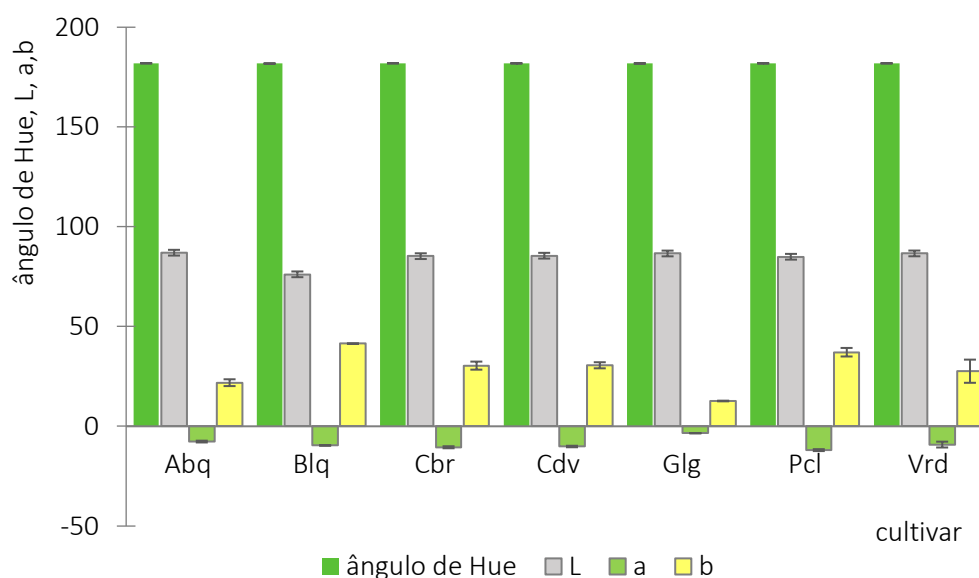


Figura 3.20 – Valores médios e desvio padrão das coordenadas CIE-L*A*B* nas diferentes amostras de azeite (Abq = Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr = Cobrançosa, Cdv = Cordovil, Glg = Galega vulgar, Pcl = Picual, Vrd = Verdeal de Serpa)

A referida tendência decrescente nos pigmentos durante a maturação é confirmada pela análise da cor do azeite. A cor verde corresponde a estágios iniciais de maturação e a cor amarelodourada aos estágios finais (Matos *et al.*, 2007).

3.11 – OLEOCANTAL E OLEACEÍNA

Através do Aristoleo® Test Kit foi possível determinar para as diferentes amostras de azeite a concentração da combinação de oleocantal (*p*-HPEA-EDA) e oleaceína (3,4-DHPEA-EDA) designada pelo índice D1 (oleocantal+oleaceína). Os valores obtidos variaram de 250 a 1000 mg/kg (Figura 3.21) demonstrando que existe uma variação significativa entre as amostras, sendo os mais elevados para as cvs. Blanqueta com 938 mg/kg, Cobrançosa e Cordovil com 1000 mg/kg e o mais baixo para a cv. Galega com 250 mg/kg.

As cultivares em estudo apresentam valores bastante elevados quando comparados com a literatura. Num ensaio com amostras de azeite provenientes de países diferentes, 158 da Grécia e 17 da Califórnia, por RMN, obtiveram-se concentrações de oleocantal e oleaceína em que os valores máximos para o índice D1 correspondiam à cv. Koroneiki proveniente da Grécia com 646 mg/kg (Karkoula *et al*, 2012). Neste mesmo estudo algumas amostras de azeite da cv. Koroneiki possuem concentrações significativamente menores que na maior parte dos casos, o que se pode atribuir a uma colheita tardia ou a temperaturas elevadas durante a processo de extração ou mesmo a ambos os fatores. Concluíram que existe uma forte correlação do índice D1 (oleocantal + oleaceína) com a colheita precoce (Karkoula *et al*, 2012). Neste estudo pode-se verificar que a variedade é o factor que interfere neste parâmetro pois para o caso da cv.Arbequina que apresenta o menor IM o teor de D1 é dos mais baixo, $438 \pm 62,5$ mg/kg.

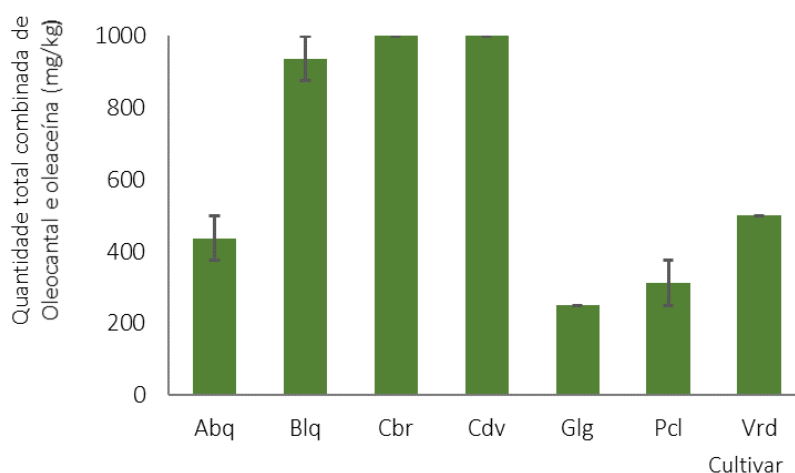


Figura 3.21 - Quantidade total combinada de oleocantal e oleaceína (Índice D1) expressa em mg por kg de azeite nas diferentes amostras (Abq=Arbequina, Blq= Blanqueta, Cbr=Cobrançosa, Cdv=Cordovil, Glg=Galega vulgar, Pcl=Picual, Vrd=Verdeal de Serpa)

Num estudo desenvolvido para a determinação do conteúdo em oleocantal e oleaceína por H-RMN em azeite virgem extra obtiveram-se valores médios de oleaceína com $64,5 \pm 7,5$ mg/kg e de oleocantal com $124,7 \pm 7,0$ mg/kg (Castilla, 2014), com um índice de 189,2 mg/kg, valor inferior comparado com da cv. Galega vulgar. Num outro estudo com azeite virgem extra proveniente da cv. Morisca através de LC-MS/MS, obtiveram concentrações de oleaceína de 519 mg/kg e de oleocantal 763 mg/kg (Castro, 2016), com um índice D1 de 1.282 mg/kg, Para um azeite com 95% de cv. Manzanilla e 5% da cv. Lechín foi obtido por HPLC um índice D1 de 1401 mg/kg (Aranzazu *et al*, 2016). Estes valores ultrapassam os valores obtidos com as cvs. Cordovil e Cobrançosa.

Como a concentração de fenóis está fortemente dependente de vários fatores, além do genótipo existem outros como o clima, a localização do olival, a colheita, os fatores agronómicos e o sistema de extração (Medina *et al*. 2017), pelo que uma comparação monovarietal deverá ser sempre relacionada com os possíveis fatores influentes. A produtividade do olival resultante de diferentes práticas agronómicas pode influenciar a evolução da maturação da azeitona e, conseqüentemente, a biossíntese dos diferentes compostos fenólicos (Peres *et al.*, 2016), o que pode explicar diferenças entre cultivares em termos de índice D1. O sistema de extração de duas fases permite obter azeite virgem extra com elevada qualidade de fenóis sendo imprescindível em anos cujas condições climáticas reduzem a concentração de secoiridóides da azeitona (Antonini *et al.*, 2015). O sistema Abencor utilizado é semelhante ao sistema de extração de duas fases, o que permitiu que na extração do azeite se preservem os fenóis.

Tanto o oleocantal como a oleaceína estão correlacionados com o amargo e pungência de alguns azeites virgem extra como referem vários estudos (Karkoula, 2012; Dermopoulos *et al*, 2015).

De acordo com a legislação da União Europeia a variação significativa observada das concentrações dos secoiridóides polifenólicos bioativos reforça a necessidade de um novo tipo de classificação do azeite (Karkoula *et al.*, 2012). Embora todas as amostras estudadas pertençam à categoria de azeite virgem extra existe uma diferença tão significativa entre elas em relação ao índice D1 que o uso desse índice pode ser usado para caracterizar a qualidade do azeite. Esses índices referem-se principalmente ao suporte de alegações de saúde, especialmente as relacionadas com o oleocantal, e são mais específicos do que o equivalente de ácido gálico relacionado com os fenóis totais. O índice D1 pode ser utilizado como suporte de alegações de

saúde uma vez que está relacionado com a regulamentação da União Europeia (Regulamento EU 432/2012 da Comissão de 16 de maio) sobre os derivados de hidroxitirosol e do tirosol do azeite virgem extra (Karkoula *et al*, 2014), sendo mais preciso e específico do que o índice de polifenóis totais normalmente utilizado, expresso em equivalentes de ácido gálico, podendo tornar-se um novo padrão para a alegação de saúde do azeite (Karkoula *et al.*, 2014).

A colheita em estágios de maturação precoce, tanto no regime de sequeiro como de regadio, para cada cultivar, origina azeites de cor verde intenso e pungentes com altos níveis de compostos fenólicos ao contrário de azeites de cor dourada e menos intensos (Peres *et al*, 2016). Pela Figura 3.22 observa-se um elevado grau de correlação entre os resultados obtidos do Chroma e do Índice D1 que permite verificar que a cor do azeite está relacionado com o conteúdo em compostos fenólicos, como referido anteriormente, ou seja à medida que a cor verde é mais intensa o teor em fenóis é maior, como se observa pelo valor de R2 próximo de 1.

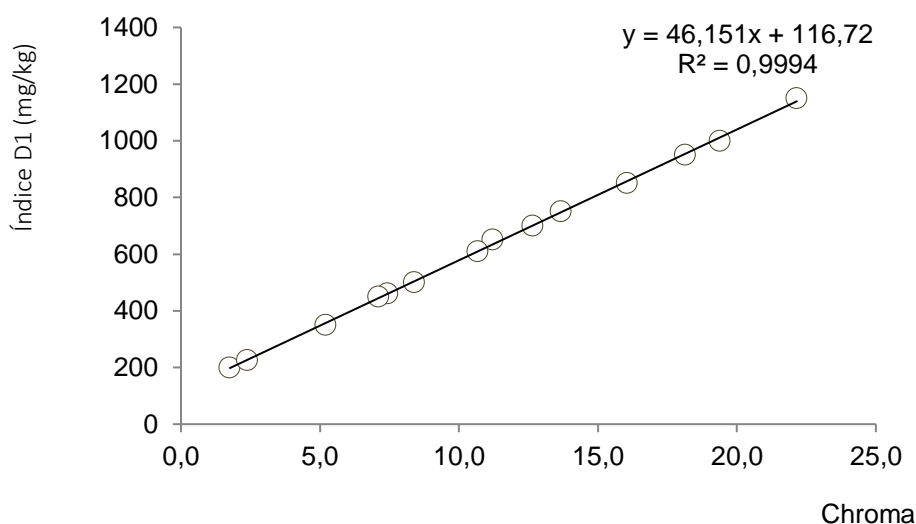


Figura 3.22 – Combinação de oleocantal e oleaceína (Índice D1) vs. Chroma das amostras de azeite

Pela conversão dos valores Chroma em concentração de oleocantal e oleaceína através da reta de correlação é possível comparar os resultados obtidos por duas vias diferentes, como se observa na Figura 3.23.

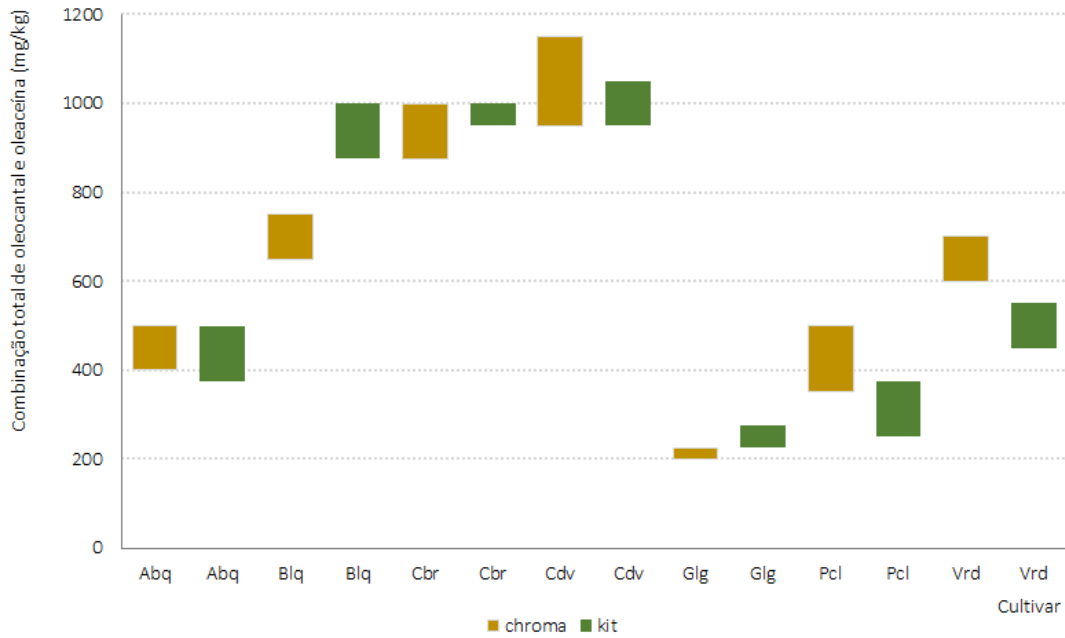


Figura 3.23 – Comparação da concentração de oleocantal e oleaceína (mg/kg) entre o Aristoleo® Test Kit e o Chroma (c*)

Pela Figura 3.23 observa-se uma uniformidade nos resultados para os azeites que apresentam uma cor mais clara. O azeite da cv. Blanqueta apresenta maior diferença entre os resultados, tal como os das cvs. Picual e Verdeal de Serpa, embora com menor diferença, coincidindo com os que apresentam cor mais escura. Com base nestes resultados para os azeites de cor mais clara é possível estimar o valor previsto do índice D1, correspondendo a valores baixos de oleocantal e oleaceína.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Sendo um dos mais importantes alimentos na dieta mediterrânica, o azeite virgem extra é único entre as gorduras vegetais, pelos seus elevados níveis de ácidos gordos monoinsaturados e pela presença de componentes menores responsáveis pelas características organoléticas e propriedades promotoras da saúde. A dieta mediterrânica está associada a uma menor incidência de arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e certos tipos de cancro, cujas propriedades foram parcialmente correlacionadas com o consumo regular de azeite virgem como principal fonte de gordura.

Enquanto a ciência avança na procura dos efeitos benéficos na saúde pelo consumo de azeite, cabe aos produtores acompanharem este progresso, extraíndo azeite que maximize as potencialidades existentes nas azeitonas, através de boas práticas culturais e de extração. Para além da garantia da qualidade química a que nos fomos habituando e do aumento da qualidade sensorial, a maximização dos componentes menores com efeito potencial na saúde está em grande parte nas mãos dos produtores: a seleção de variedades adequadas, o controlo de pragas e doenças, a colheita atempada dos frutos em estados de maturação mais precoces do que era tradicional, os cuidados na extração do azeite e a sua preservação durante o armazenamento, evitando a sua oxidação, são fatores que maximizam o potencial biológico do azeite.

Os resultados deste estudo demonstram os índices de qualidade e a composição fenólica dos diferentes azeites que resultaram de azeitonas em ótimas condições, processadas após um curto espaço de tempo da colheita por um sistema de extração adequada. Todos os azeites em estudo alcançaram os níveis padrão de qualidade regulamentados, no entanto algumas cultivares como a Blanqueta, a Cobrançosa e a Cordovil apresentaram valores de oleocantal e oleaceína que permitem a utilização das alegações de saúde estabelecidos pela União Europeia.

Devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos e baixa presença de pigmentos cloroplásticos os azeites têm boa estabilidade oxidativa, além da sua capacidade antioxidante também contribuir para a sua validade *shelf-life*. Os teores de flavonóides e compostos fenólicos totais variam com o estado de maturação da azeitona e técnicas de produção, demonstrando a importância de se entender o seu comportamento particular para cada cultivar.

O elevado teor de hidroxitirosol e seus derivados poderão conferir ao azeite ações de proteção à saúde e, conseqüentemente, uma melhor valorização no mercado. Com base nos resultados obtidos consegue-se categorizar os azeites estudados por níveis. Embora todas as amostras estudadas pertençam à categoria de azeite virgem extra existe uma diferença significativa em relação ao índice D1, em que a sua utilização poderia caracterizar a qualidade superior do azeite. Esse índice refere-se ao teor em oleocantal e oleaceína, sendo mais específicos do que o equivalente de ácido gálico relacionado com a atividade antioxidante.

No entanto, não será só um desafio para os produtores obter um sabor equilibrado e alta concentração de polifenóis específicos, como também para os consumidores aceitar e valorizar as características organolépticas de um azeite virgem extra de qualidade superior.

O desafio do mercado global está focado não só para produtos com qualidade certificada, que garantam a segurança alimentar, como também incluam a biodiversidade de cultivares de azeitona, que disponibilizam um potencial de características promissoras a serem desvendadas.

5 BIBLIOGRAFIA E REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AFGAlimentar (2018). Acedido em 8 de setembro, em

<http://www.afg.com.pt/alimentar/pages/display/olive-oil-regions/language:PT>

Aguilera, M.; Beltrán, G.; Ortega, D.; Fernández, A.; Jiménez, A.; Uceda, M. (2005). Characterization of virgin olive oil of italiano olive cultivars “Frantoio” and “Leccino” grown in Andalusia. *Food Chemistry* 89: 387-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.046>

Alba, J. (1998). Elaboración de aceite de oliva virgen. In: *El cultivo del olivo*, 2ª edición, 17, 517-545 ISBN 84-7114-707-6

Alowaiesh, B.; Singh, Z.; Fang, Z.; Kaillis, S. (2018). Harvest time impacts the fatty acid compositions, phenolic compounds and sensory attributes of Frantoio and Manzanilla olive oil. *Scientia Horticulturae* 234, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.017>

Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.; Bektaşoğlu, K.; Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496-1547. <https://doi.org/10.3390/12071496>

Aparício, R.; Harwood, J. (2003). Manual del Aceite de Oliva. AMV-Mundiprensa, Madrid. ISBN 978-84-8476-729.9.

Aparício, R.; Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal Lipid Scientific Technology* 104, 614-627. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L)

Aparício, R.; Morales, M.; Alonso, M. (1996). Relationships between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *JAOCs* 73 (10), 1253-1264.

Aparício, R.; Roda, R.; Albi, M.; Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 4150-4155. <https://doi.org/10.1021/jf9812230>

Aristoleo (2018). Acedido a 25 de maio de 2018, em www.aristoleo.com

Avillez, F. (2016). A importância económica do sector do azeite. Seminário ‘O sector do azeite em Portugal. Crescimento e competitividade. *Agroges*.

Baer, I. (2015). Rastreabilidade de azeites virgens provenientes das cultivares Cordovil de Serpa e Galega vulgar na região Alentejo. Dissertação de Doutoramento em Ciências Biotecnológicas. Universidade do Algarve.

Baltasar, M. (2014). Influencia del estado de madurez del fruto sobre parâmetros de calidad, compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes de aceites de oliva virgenes extremeños. Aprovechamiento de subproductos de almazara. Tesis doctoral de la Universidad de Extremadura, Espanha.

- Barranco, D. (2004). Variedades y Patrones in Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2004) – El cultivo del olivo. 5ª edición, Ediciones Mundi-Prensa. Junta de Andalucía. ISBN:978-84-847-329.1
- Barranco, D.; Rallo, L.; Uceda, M.; Hermoso, M. (1994). “Fichas varietales del olivo”. Departamento de agronomía de la Universidad de Córdoba y Departamento de Olivicultura de la Finca “Venta del Llano” en Mengibar (Jaén).
- Barrio, A.; Gutiérrez, F.; Gutiérrez, R. (1981). Gas liquid chromatography application, a head space technic to the olive oils atrojado problema. *Grasas y Aceites* 32.
- Barros, L.;Carvalho, A.; Morais, J.; Ferreira, I. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120, 247-254 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.016>
- Bassi, M. (2014). Sviluppo chimico e analítico dei componenti nutraceutici dell’olio d’oliva a strutturafenolica e polifenolica. Corso di laurea specialista in chimica e tecnologia farmaceutiche. Università di Pisa. Itália.
- Beauchamp, G.; Keast, R.; Morel, D.; Lin, J.; Pika, J.; Hanjj, Q; Lee C.; Smith, A.; Breslin, P. (2005) Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46. <https://doi.org/10.1038/437045a>
- Beltrán, G.; Del Río, C.; Sánchez, S.; Martínez L. (2004). Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *Journal Sciences Food Agriculture*, 84, 1783-1790. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1887>
- Beltran, G.; Uceda, M.; Hermoso, M.; Frias, L. (2004). Maduración in Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2004) – El cultivo del olivo, 5ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Junta de Andalucía. ISBN:978-84-847-329.1
- Beltran, G; Jiménez, A.; Uceda, M. (1995) Efecto del régimen hídrico de cultivo sobre la fracción fenólica del aceite de oliva de la variedad Arbequina – *Actas del 1er.Simpósio del olivo Arbequina en Catalunya*. Borjas Blancas., 153-155.
- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaco, A.; Segura-Cerretano, A.; Fernandez-Gutiérrez, A. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils, a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. Na overview od the lat decade. *Molecules* 12, 1679-1719. <https://doi.org/10.3390/12081679>
- Bertrán, E.; iturriaga, H.; Maspoch, S.; Montoliu, I. (2001). Effect of orthogonal signal correction on the determination of compounds with very similar near infrared spectra. *Analytica Chimica Acta* 431, 303-311. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01328-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01328-3)
- Boskou, D. (1996). Olive Oil: Chemistry and Technology (Boskou, D., Vol. 41, pp. 101-120). Champaign: AOCS Press. <https://doi.org/10.1201/9781439832028>
- Boskou, D. (1998). Química y tecnología del aceite de oliva. Departamento de Química. Universidad Aristóteles de Salónica. Grécia. ISBN: 84-89922-06-3.
- Boskou, D. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in *Fdo.Sicence &Technology* 17 (9), 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.004>

Boskou, D. (2009). Phenolic compounds in olives and olive oil. *Olive Oil: Minor Constituents and Health*. Ed. D. Boskou, CRC Press, Flórida.

Bourquelot, E.; Vintilesco, C. (1908) *Hebd Seances Acad. Sciences* 147, 533-535. Citado por: Jiménez, B. (2012). Evolución del perfil sensorial del aceite de oliva vírgen en la maduración y su influencia en el diseño de la almazara. Tese doctorado en Farmacia. Universidad de Granada. Espanha.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. u. Technology* 28, 25-30 [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J.; Garrido, J. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47, 3535-3540. <https://doi.org/10.1021/jf990009o>

CAP-Confederação dos agricultores de Portugal (2017). Retrato da olivicultura em Portugal/COI, Informação do sector do azeite, pp3.

Casa do Azeite - Associação do Azeite de Portugal (2018). Acedido a 8 de setembro de 2018, em www.casadoazeite.pt

Casal, S.; Santos, C.; Pereira, J. (2017). Valorizar azeites virgens: a importância das alegações de saúde. *Voz do Campo, Agrociência*, Fevereiro, II-III.

Casas, J. & Bueno, E. (2003). Experimentación, investigación y tecnología para el sector oleícola extremeño. *Anfora* 1, 20-23.

Cayuela, J.; Garcias, J.; Caliani, N. (2009). NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. Department of Physiology and Technology of Plant Products. Instituto de la Grasa (CSIC). *Grasas y Aceites*, 60 (2), abril-junho, 194-202. <https://doi.org/10.3989/gya.097308>

CE- Comissão Europeia (2012) O sector do Azeite na União Europeia. Dir. Geral da Agricultura pp6.

Cert, A.; Moreda, W.; Garcia-Moreno, J. (1997). Determinación de esteroides y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y por análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites* 48, 207-218.

Chimi, H.; Sadik, A.; Le Tutour, A.; Rahmani, M. (1998). Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol de l'hydroxytyrosol, de l'acide cafeique, de l'oleuropeine et du BHT. *Reviste Fr. Corps Gras* 35, 339-344. Citado por: García, J.; Pérez-Camino, M. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 3516-3520.

Cicerale, S.; Lucas, J.; Keas, R. (2012). Oleocanthal: A Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agent in Virgin Olive Oil in: Boskou, D., *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversion*, *InTech Europe* 19, 357-374.

CIHEAM-Centre international de hautes études agronomiques méditerranéennes (2018). Acedido em outubro, em <http://www.mediterradiet.org>

Cirimina, R.; Meneguzzo, F.; Fidalgo, A.; Ilharco, L.; Pagliaizo, M. (2016). Extraction, benefits and valorization of olive polyphenols. *European Journal Lipid Science Technology* 118, 503-511. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500036>

Civantos, C. (1999). Obtención del aceite de oliva. 2ª Edición. Editorial Agrícola Española, S. A. Madrid.

CNUCED-Conferência das Nações Unidas sobre comércio e desenvolvimento (2016). Acordo internacional de 2015 sobre o azeite e as azeitonas de mesa de 28 de outubro. Jornal Oficial da União Europeia 293, 5-23. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

COI-Consejo Oleícola internacional (2000). Catálogo mundial de variedades de olivo. Espanha. ISBN 84-931663-3-2

COI-Consejo Oleícola internacional (1996). Enciclopédia mundial da oliveira, Capítulo 7 – Tecnologia de produção, 253-294.

COI-Consejo Oleícola internacional (2011). Guide for the determination of the characteristics of oil-olives. COI/OH/Doc.Nº.1, November.

COI-Consejo Oleícola internacional (2016). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Consejo Oleícola Internacional COI/T.15/NC nº3/Revisão.11, Versão espanhola, 18 pp.

COI- Consejo Oleícola internacional (2017) Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. T20/Doc 15/ Rev.9.

COI- Consejo Oleícola Internacional (2015). Estudio internacional sobre costes de producción del aceite de oliva: resultados, conclusiones y recomendaciones. 40 pp.

COI-Consejo Oleícola internacional (2006). Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T.15/NC no.3/Rev.2. Madrid, Espanha.

COI-Conselho Oleícola Internacional (2006). Guia de gestão de qualidade de la indústria del aceite de oliva: las almazaras 33 /doc nº 2-4, pp 20.

COI-Conselho Oleícola Internacional (2017). La oleicultura en Portugal, Newsletter-Mercado oleícola nº114- março, 7 pp.

COI-Conselho Oleícola Internacional (2018). Acedido a 8 de setembro em www.internationaloliveoil.org

Conceição, A.; Gouveia, C.; Vitorino, M.; Henriques, L.; Peres, M. (2003). Azeite 'Galega vulgar': evolução sensorial durante a maturação na campanha 2000/01. *Actas Portuguesas de Horticultura* 13, 221-226.

CONFAGRI (2018) Acedido em 16 de outubro em <https://www.confagri.pt>

Connor, D. & Fereres, E. (2005). The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Horticultural Reviews* 31, 155-229 ISBN0-471-66694-7

Coosur (2018). Acedido em 8 de setembro, em www.coosur.com

Cordeiro, A.; Inês, C. (2017). O ciclo anual da oliveira, a fenologia e as práticas culturais no olival. INIAV.IP., Vida Rural - Olivicultura janeiro, fevereiro, março, 10-12.

Cordeiro, A.; Inês, C.; Quintans, F.; Mouro, F. (2016). A fenologia da maturação e a oportunidade de colheita da azeitona, INIAV.I, Vida Rural - Olivicultura abril / maio / junho, 10-12.

Costa, H. (2012). Azeites Aromatizados: Estudo da Influência do agente aromatizante na composição química e resistência à oxidação. Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança.

COTR- Centro Operativo e de Tecnologia do regadio (2017). Boletim Agrometeorológico do Alentejo, outubro, novembro, dezembro.

Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM* 23 (6), 80-84.

Cunha, S. (2007). Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas. Tese de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Czerwinska, M.; Kiss, A.; Naruszewicz, M. (2014). Inhibition of human neutrophils NEP activity, CD11b/CD18 expression and elastase release by 3, dihydroxyphenylethanol oleonic acid dialdehyde, oleacein. *Food Chemistry* 153, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.019>

Dabbou, S.; Chehalo, H.; Taticchi, A.; Servili, M.; Hammami, M. (2015). Content of fatty acids and phenolics in Coratina olive oil from Tunisia: influence of irrigation and ripening. *Chemistry & Biodiversity* 12, 397-406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.019>

Del Carlo, M.; Sacchetti, G.; Di Mattia, C.; Compagnone, D.; Mastrocola, D.; Liberatore, L.; Cicheli, A. (2004) Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of the olive oils. *Journal Agriculture Food Chemistry* 52, 4072-4079. <https://doi.org/10.1021/jf049806z>

DGADR (2018). Produtos tradicionais portugueses. Acedido em 8 de novembro de 2018 em www.dgadr.gov.pt

Dominguez, L.; Barbagallo, M. (2007). Dieta mediterranea e longevità: ruolo dell'olio extravergine di oliva. *Società italiana di Gerontologia e Geriatria. G.Gerontol* (55) 231-238.

EDIA- Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva (2017). Anuário Agrícola do Alqueva 2017. Direção de Economia da Água e Promoção do Regadio. Departamento de Planeamento e Economia da Água, 102-107.

El Sohaimy, A.; El-Sheikh, H.; Refaay, M.; Zaytoun, A. (2016). Effect of harvesting in different ripening stages on olive (*Olea europaea*) oil quality. *American Journal of Food Technology* 11, 1-11. <https://doi.org/10.3923/ajft.2016.1.11>

Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvado, J.; Covas, M.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-García, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Laetra, J.; Lamuela-Raventos, R.; Serra-Majem, L.; Pintó, X.; Basora, J.; Muñoz, M.; Sorlí, J.; Martínez, J.; Martínez-Gonzalez, M. (2013) Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England Journal of Medicine* 368 (14) 1279-1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). FAOSTAT. Acedido em 17 de setembro em www.fao.org

Fedeli, E. (1996). Tecnologia de produção e conservação do azeite. In: Enciclopédia mundial da Oliveira. *Conselho Oleícola Internacional*, 253-294. ISBN: 84-01-61942-4.

Fedeli, E.; Jacini, G. (1971). Lipids composition of vegetable oils. *Advances in Lipids Res* 9: 335-382. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-024909-1.50014-4>

Fedeli, E.; Testolin, G. (1991). Edible fats and oils. In: The mediterranean diets in health and disease. Ed. Spiller, G. Health research and studies centre, Los Altos, California and Sphera Foundation: Van Nostrand Reinhold, Nova Iorque.

Fernandes, M. (s.d.), A Dieta Mediterrânica: uma porta aberta para novos mercados - O caso do Azeite. Secretariado executivo do Conselho Oleícola Internacional, *Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agro-Alimentares*, 12 pp.

Firestone, D. (2005). Olive Oil. In: Bailey's industrial oil & fat products.. Volume I. 6th Edition, Edited by Fereidoon Shahidi. ISBN: 978-0-471-38460-1.

Franco, M.; Galeano-Diaz, T.; Sánchez, J.; De Miguel, C.; Martín-Vertedor, D. (2014). Antioxidant capacity of the phenolic fraction and its effect on the oxidative stability of olive oil varieties grown in the south-west of Spain. *Grasas y Aceites* 65 (1). <https://doi.org/10.3989/gya.051513>

Frías Ruiz, L.; Garcia -Ortiz Rodrigues, A.; Hermoso Fernández, M.; Jiménez Márquez, A.; Llavero del Pozo, M.P.; Bernardio Morales, J.; Ruano Ayuso, M.T.; Uceda Ojeda, M. (1999). Analistas de laboratório de almazara. Olivicultura y Olaiotecnica. *Consejería de Agricultura y Pesca*, 28-30.

García, J.; Pérez-Camino, M. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 3516-3520. <https://doi.org/10.1021/jf950585u>

García, J.; Yousfi, K.; Oliva, J.; García-Diaz, M.; Pérea-Camino, M. (2005). Hot water dipping of olives (*Olea europaea*) for virgin oil debittering. *Journal Agriculture Food Chemistry* 53 (21), 8248-8252. . <https://doi.org/10.1021/jf050616d>

Garcia, L. (2018). Relevant applications in food metabolomics: characterization of products and by-products derived from the olive tree. Doctoral thesis in chemistry. Universidad de Granada.

Garcia-González, D.; Aparício, R. (2010). Research in olive oil: challenges for the near future. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 58,12569-12577. <https://doi.org/10.1021/jf102735n>

Gómez, P.; Lasta, D.; Porcú, E.; Bravo, M.; Nieto, S.; Herrera, R.; Kaen, R. (2006). Ensayo de conservación de aceites de oliva de la variedad arbequina. *Revista del Cizas*, 7: 47-54.

Gorinstein, S.; Yamamoto, K.; Katrich, E.; Leontowicz, M.; Ciz, M.; Goshev, I.; Shalev, U.; Trakhtenberg, S. (2003) Antioxidative properties of Jaffa sweets and grapefruit and their influence on lipid metabolism and plasma antioxidative potential in rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 67,907-910. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.907>

Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello F.; Kuban-Jankowska, A.; Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences* 19(3),547, 13pp. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>

Gouveia, C.; Peres, M.; Vitorino, M.; Henriques, L.; Pinheiro-Alves, M. (2003). Polifenóis e tocoferóis em azeites monovarietais. *Actas Portuguesas de Horticultura* 13, 209-214.

Gouveia, J. (1995). Azeites Virgens do Alto Alentejo – Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Gouveia, J. (1996). IX Curso Internacional sobre a melhoria de Qualidade do Azeite. Lisboa.

Gouveia, J.; Saldanha, J.; Martins, A.; Modesto, M.; Sobral, V. (2002). O azeite em Portugal. Edições Inapa.

Gouveia-Martins, C.; Vitorino, M.; Peres, M.; Henriques, L.; Pinheiro-Alves, M. (2001). Antioxidantes naturais em azeites monovarietais da parte sul do distrito de Castelo Branco. XV Encontro Galego-Português de Química, 21-23 de novembro. Coruña. Citado por Pintado, C.; Peres, C.; Pinheiro-Alves, M.; Peres, F. (2007). Azeites de produção biológica e produção integrada – avaliação de critérios de qualidade. *Revista de Ciências Agrárias*, 362-366.

Gouvinhas, I.; Almeida, J.; Carvalho, T.; Machado, N.; Barros, A. (2015) Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chemistry* 174, 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.037>

GPP -Gabinete de Planeamento e Políticas (2007). Olivicultura – Diagnóstico sectorial. Ministério de Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, pp 52.

GPP-Gabinete de Planeamento e Políticas e Administração geral. (2018). SIAZ - Sistema de Informação do azeite e azeitona de mês. Acedido em 24 de setembro, em www.gpp.pt/index.php/estatisticas-e-analises/siaz-sistema-informacao-sobre-azeite-e-azeitona-de-mesa

GPP-Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração geral (2017), Ficha de Internacionalização do Azeite- Informação sobre produtos e mercados, GLOBALAGRIMAR, 7 pp.

Guerrero, A. (1997). Nueva olivicultura. 4ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Guillén, J. & López-Villalta, M. (1992) – Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo. 21/92 Apuntes para cursos. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura e Pesca, *Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria e Pesquera*.

Guillén, M.; Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry* 77, 503-510. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00371-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00371-5)

Gutierrez, F.; Perdiguero, S.; Gutiérrez, R.; Olias, J.(1992) Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *Instituto de la Grasa* 69 (4) 394-395.

Gutiérrez, F.; Arnaud, T.; Garrido, A. (2001). Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (15), 1463-1470. <https://doi.org/10.1002/jsfa.958>

Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruíz, A.; Albi, A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on different components

involved. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 121-127. <https://doi.org/10.1021/jf980684i>

Gutiérrez, F.; Perdiguero, S.; Gutiérrez, R.; Olias, J. (1992). Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *Journal American Oil Chemists' Society* 69 (4), 394-395.

Harbone, J. (1989). General procedures and measurements of total phenolics. In: Harborne, J. Ed. *Plant Phenolics*, vol 1, from *Methods in Plant Biochemistry Series*: Academic Press, London, 1-28.

Henriques, L.; Peres, M.; Vitorino, M.; Pinheiro-Alves, M.; Simões, P. (2001). Estabilidade relativamente à oxidação de azeites monovarietais da Beira Baixa. *Revista das Ciências Agrárias XXIV* (1 e 2), 193-198.

Hermoso, M.; Uceda, M.; Garcia-Ortíz, A.; Morales, B.; Frías, L.; Fernández García, A. (1991). Elaboración de aceite de oliva de calidad. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.

Hermoso, M.; Uceda, M.; Garcia-Ortíz, A.; Jiménez, A.; Beltrán, G. (1997). Second centrifugation of olive paste. Oil recuperation percent and olive characterization. *Acta horticulturae, proceeding of the third international symposium on olive growing* 474, 721-724. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.474.150>

Hermoso, M.; Uceda, M.; Frías, L.; Beltrán, G. (1998). Maduración. In: *El cultivo del olivo*. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 145-161.

Hermoso, M.; González, J.; Uceda, M.; García-Ortiz, A.; Morales, J.; Frías, L.; Fernández, A. (1998a). Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Serie de apuntes 61/1998. Citado por Sánchez, A.; Marto, N.; Ballesteros, E. (2005). Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopia de NIR e RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén. *Grasas y Aceites* 55 (3), 220-227.

Herrera, B.; Velasco, A.; Sánchez-Ortiz, A.; Lorenzo, M.; Úbeda, R.; Callejón, R.; Ortega, E. (2012). Influencia del proceso de maduración del fruto en la calidad sensorial de aceites de oliva virgen de las variedades Picual, Hojiblanca y Picudo. *Grasas y Aceites* 63 (4), 403-412. <https://doi.org/10.3989/gya.058212>

Herrera, B.; Castillo, B.; Ayerbes, J.; Torti, S.; Ordóñez, J.; Caballero, F. (1999). Informe sobre el Proyecto de Concertación para la Mejora de la Calidad del Aceite de Oliva en las Comarcas de la Sierra y Valle de los Pedroches, Campiña y Penibética de la Provincia de Córdoba. Federación Andaluza de Empresas Cooperativas Agrarias. Consejería de Agricultura y Pesca. *Dirección General de Investigación y Formación Agraria*.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Humanes, J.; Civantos, M. (1992). Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo. Junta de Andalucía, Sevilla, Espanha. Citado por García, J.; Pérez-Camino, M. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 3516-3520.

Humanes, J.; Civantos, M. (2001). Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia del cultivo. 2ª Edición. Junta de Andalucía. *Consejería de Agricultura y Pesca*, Sevilha.

Inarejos-Garcia, A.; Gómez-Rico, A.; Desamparados, M.; Fregapone, G. (2010) Effect of preprocessing olive storage conditions on virgin olive oil quality and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4858-4865. <https://doi.org/10.1021/jf902486f>

INE- Instituto Nacional de Estatística (2018). Instituto Nacional de estatística PORDATA. Acedido em 5 de outubro em <https://www.pordata.pt>

Inês, C. (2015). Variedades de olivo: caracterización de los primeros estádios del desarrollo vegetativo y reproductivo. Tesis doctoral Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Univerisdad de Extremadura. Badajoz.

Liñón, F.; Garrigues, J.; Garrigues, S.; Molina, A.; De la Guardia, M. (2003). Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares–attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 489, 59-75. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00711-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00711-6)

Jiménez, A.; Beltrán, G.; Uceda, M.; Herrera, M. (2006). Empleo de ultrasonidos de potencia en el processo de elaboración de aceite de oliva virgen. Resultados a nível de planta de laboratório. *Grasas Y Aceites* 57 (3), 253-259.

Jiménez, A.; Izquierdo, E.; Rodriguez, F.; Dueñas, J.; Tortosa, L. (2000). Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarojo cercano. *Grasas Y Aceites*, 51 (5), 311-315

Jimenez, B. (2011). Evolución del perfil sensorial del aceite de oliva virgen en la maduración y su influencia en el diseño de la almazara. Tesis de Doctoral en Farmacia. Universidad de Granada.

Jiménez, B.; Sanchez-Ortiz, A.; Lorenzo, M.; Rivas, A. (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters quality índices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Research International* 54, 1860-1867. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.016>

Jiménez, B.; Velasco, A.; Sánchez-Ortiz, A.; Lorenzo, M.; Úbeda, M.; Callejón, R.; Ortega, E. (2012). Influencia del processo de maduración del fruto en la calidad sensorial de aceites de oliva virgen de las variedade Picual, Hojiblanca y Picudo. *Grasas y Aceites* 63 (4), 403-412.

Jiménez, J.; Rondón, D.; Martínez, L.; Mataix, J. (2001). Composición química de los aceites de oliva, in: Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentário. Ediciones Universidad de Granada-Puleva Food, 115-136.

Kalua, C.; Bedgood, D.; Bipshop, A.; Prenzler, P. (2008). Changes in virgin olive oil quality during low-temperature fruit storage . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (7), 2415-2422. <https://doi.org/10.1021/jf073027b>

Karkoula, E.; Skantzari, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. (2012). Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative HNMR. Establishment of a new índice for the characterization of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11696-11703. <https://doi.org/10.1021/jf3032765>

Kedage, W.; Tilak, J.; Dixit, G.; Devassagayam, T.; Mhatre, M. (2007). A study of antioxidant properties of some varieties of grapes. *Vitis vinífera L. Crit. Ver. Food Science Nutrition* 472, 175-185. <https://doi.org/10.1080/10408390600634598>

Kiritsakis, A. & Christie, W. (2000). Analysis of Edible Oils. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 129-158. ISBN: 0-8342-1633-7. ISBN 978-1-4419-5194-6

Kiritsakis, A. (1992). El Aceite de Oliva. A.Madrid Vicente, Edic., Madrid. ISBN: 84-87440-28-2.

Kiritsakis, A. (1998) Flavors componentes of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75, 673-678.

Lavee, S. (1996). Biología y fisiología del olivo. Enciclopedia mundial del olivo. COI 61-110.

Leitão, F.; Potes, M.; Calado, M. & Almeida, F. (1986) – Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral de Planeamento e Agricultura. Lisboa.

Lercker, G.; Caramia, G. (2010). Composizione ed aspetti salutistici dell'olio d'oliva. La rivista italiana delle sostanze grasse LXXXVII, Vol. Luglio/Settembre, 147-169.

Lucas, L.; Russell, A.; Keast, R. (2011) Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design* 17:754-768. <https://doi.org/10.2174/138161211795428911>

Luna, G.; Morales, M.; Aparício, A. (2005). Characterisation of 38 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98, 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.069>

Magalhães, L.; Segundo, M.; Reis, S.; Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613(1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>

Maia, F. (2014). Estudo de estabilidade oxidativa em azeites monovarietais. Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Malik, N.; Bradford, J. (2006). Changes in oleuropeín during differentiation and development of floral buds in Arbequina olives. *Science horticulturae* 110, 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.016>

Mansouri, F.; Bem, A.; Lopez, G.; Fauconnier, M.; Sindic, M.; Serghini-Caid, H.; Elamrani, A. (2013). Preliminary characterization of monovarietal virgin olive oils produced in eastern área of Morocco. *Inside Food Symposium*, 9-12 April, Leuven, Belgium, 6 pp.

Mansouri, F.; Moumen, A.; Houmy, N.; Richard, G.; Fauconnier, M.; Sindi, M.; Serghini-Caid, H.; Elamrani, A. (2014). Evaluación de la estabilidad oxidativa de los aceites de oliva obtenidos a partir de la mezcla de aceite 'Arbequina' con otros aceites de oliva monovarietales. *OLIVAE* 120,23-30.

Martínez, L.; Hodaifa, G.; Lozano, J. (2010) Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2393-2398. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4097>

Martins, B. (2015). Azeites virgens: efeito da cultivar na composição química e estudo da adição de agentes para incremento de antioxidantes quando sujeitos a aquecimento em micro-ondas.

Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança, 90 pp.

Mataix, J.; Carazo, E. (1995). El Aceite de oliva en la dieta y salud humanas. citado por Martínez de Victoria, E.; Mañas, M. (1997) in: El cultivo del olivo. 2ª Edición, (20), 597-613. ISBN: 84-7114-707-6.

Mateos, R.; García-Ortiz, C.C.; García, J.A.M. (2014) Método rápido de determinación del amargor en aceite de oliva virgen sin previa separación. Foro de la Tecnología Oleícola y la Calidad. TEC 41 Expoliva IFAPA, Jaén, España.

Matos, L.; Cunha, S.; Amaral, J.; Pereira, J.; Andrade, P.; Seabra, R.; Oliveira, B. (2005). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal de Serpa Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry* 102, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.031>

Matos, L.; Pereira, J.; Andrade, P.; Seabra, R.; Oliveira, M. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry* 102, 976-983 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.026>

Mendez A.; Falque E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control* 18, 521- 529. Citado por Vekian, S.; Papadopoulou, P., Kiritsakis, A. (2007). Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes. *Grasas y aceites* 58 (3), 237-242. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i3.178>

MERCACEI (2018) - Publicaciones especializadas en aceite de oliva y olivar. Acedido em outubro em <https://www.mercacei.com/noticia/44141/actualidad/nace-la-oleocanthal-international-society.html>

Miceli, N.; Trovato, A.; Dugo, P.; Cacciola, F.; Donato, P.; Marino, A.; Bellinghieri, V.; La Barbera, T.; Güvenç, A.; Taviano, M. (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6570–6577. <https://doi.org/10.1021/jf9012295>

Minguez-Mosquera, M.; Rejano, L.; Gandul, B.; Sánchez, A.; Garrido, J. (1991). Color pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of American Olive Oil Chemists Society*, 68, 332-336 <https://doi.org/10.1007/BF02657688>

Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. (1993). Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41 (11), 2228-2234.

Moon, J.; Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57, 1655 - 1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>

Morales, M.; Ríos, J.; Aparício, R. (1997). Changes in volatiles composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 45, 2666-2673. <https://doi.org/10.1021/jf960585>

Morelló, J.; Vuorela, S.; Romero, M.; Motulva, M.; Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *Journal Agriculture Food Chemistry* 53, 2002-2008. <https://doi.org/10.1021/jf048386a>

Muik, B.; Leudl, B.; Molina-Díaz, A.; Pérez-Villarejo, L.; Ayora-Cañada (2004). Determination of oil and water content in olive pomace using near infrared and Raman spectrometry. A comparative study. *Anal Bioanal Chem* 379, 35-41. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2493-5>

Muñoz-Aranda, E.; Alba, J. (1980). Informe de la almazara experimental del instituto de la grasa correspondiente a la campaña 1979-1980. *Grasas y Aceites* 31, 423-433.

Neveu, V.; Perez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; Du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; Scalbert, A. (2010). Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* 1-9. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>

Olias, J.; Pérez, A.; Ríos, J.; Sanz, L. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the green odor notes. *Journal Agriculture Food Chemistry* 41, 2368-2373.

Oliveoilmarket (2018). Acedido em 24 de setembro em <https://www.oliveoilmarket.eu/trends-in-world-olive-oil-consumption/>

Ortega, D.; Belrán, G.; Aguilera, M.; Uceda, M. (2004). Influencia del régimen hídrico en la formación de aceite en Arbequina. Estación de olivicultura y olivicultura CIFA, *Vida Rural – Dossier Olivar*- Noviembre, 60-64.

Owen R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chemistry Toxicology*, 38, 647-659. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00061-2)

Parkinson, L.; Keast, L. (2014). Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 12323-12334. <https://doi.org/10.3390/ijms150712323>

Pascoal, A.; Quirantes-Piné, R.; Fernando, A.; Alexopoulou, E.; Segura-Carretero, A. (2015), Phenolic composition and antioxidant activity of kenaf leaves, *Industrial Crops and Products* 78, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.028>

Pasqualone, A.; Calalano, M. (2000). Free and total sterols in olive oil. Effects of neutralization. *Grasas y Aceites* 51, 180-182. <https://doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i3.476>

Pastor, C.; Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.026>

Pereira, J.; Alves, M.; Casal, S.; Oliveira, M. (2004). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana. *Journal Food Science* 3 (16), 355- 365.

Peres, F.; Martins, L.; Ferreira-Dias, S. (2012). Otimização da extração de azeite de azeitona Cobrançosa por adição de adjuvantes tecnológicos. VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela. *Atas Portuguesas de Horticultura* 21,375-380.

Peres, F.; Nunes, A.; Vitorino, C.; Gouveia, C.; Henriques, L. (2009). Antioxidantes em azeites 'Galega' e 'Azeiteira' provenientes de frutos obtidos em duas épocas de colheita. *Actas Portuguesas de Horticultura* 14, 120-126.

Peres, M.; Henriques, I.; Simões-Lopes, P.; Pinheiro-alves, M. (2003). Azeites da Galega vulgar – efeito do loteamento e do armazenamento. *Actas Portuguesas de Horticultura* 13, 186-191.

Pinheiro-Alves, M.; Lopes, P.; Peres, M.; Henriques, L. (2002). Loteamento de azeites virgens produzidos no Norte Alentejano. *Melhoramento* 38, 259-265. Citado por: Pita, D., Vitorino, M., Gouveia, C., Peres, F. (2011). Aplicação de microtalc natural na extração de azeites monovarietais, V Simpósio Nacional de Olivicultura, Santarém. *Actas Portuguesas De Horticultura*, 14, 151-157.

Pintado, C.; Peres, C.; Pinheiro-Alves; M.; Peres, F. (2007). Azeites de produção biológica e produção integrada – avaliação de critérios de qualidade. *Revista de Ciências Agrárias*, 362-366.

Pires, J.; Souza V.; Fernando, A. (2018). Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. *Food Packaging and Shelf Life* 17, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.011>

Pita, D.; Vitorino, M.; Gouveia, C.; Peres, F. (2011). Aplicação de microtalc natural na extração de azeites monovarietais. *Actas Portuguesas de Horticultura* 14, 151-157.

Pizarro, C.; Esteban-Diez, I.; Rodriguez-Tecedor, S.; González-Saiz, J. (2013). Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control* 34, 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.025>

Primo, E. (1997). *Química dos alimentos*, Ediciones Síntesis, S.A. Madrid, 164-227.

Quora (2018). Acedido em 8 de setembro, em <https://www.quora.com/What-is-extra-virgin-olive-oil>

Rallo, L. (2002). La mejora varietal del olivo en España. Séminaire international sur l'olivier: Acquis de recherche et contraintes du secteur oléicole. Marrakech, Marrocos.

Ramalheiro, J. (2009). Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar-Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Ranalli, A.; Pollastri, L.; Contento, S.; Iannucci, E.; Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 57–67. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390018>

Rapoport, H. (2004) – *Botánica y morfología* in Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2004) – *El cultivo del olivo*, 5ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Junta de Andalucía, pp 35-60.

Rebello, J.; Caldas, J. (2012). Support for farmers' cooperatives. Country report Portugal. UTAD-Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Projeto financiado por European Commission DG Agriculture and Rural Development. Wageningen UR's Agriculture Economics Research Institute LEI and Wageningen University, 30,51.

Regulamento (CE) 432/2012 de 16 de maio. Jornal Oficial da União Europeia, L 136. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 1234/2007 do Conselho de 22 de outubro, Anexo XVI. Jornal Oficial da União Europeia, L 299. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 702/2007 de 21 de junho. Jornal Oficial da União Europeia L 161. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº1989/2003 de 6 de novembro. Jornal Oficial da União Europeia L 295. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (CEE) nº 2568/1991 de 11 de julho. Jornal Oficial da União Europeia L248. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento (EU) 61/2011 de 24 de janeiro. Jornal Oficial da União Europeia, L 23. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento de Execução (EU) 2016/1227 de 27 de julho. Jornal Oficial da União Europeia L202. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 de 12 de outubro. Jornal Oficial da União Europeia L266. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento de Execução (UE) 2016/1784 de 30 de Setembro. Jornal Oficial da União Europeia L273. *Comissão Económica Europeia*. Bruxelas.

Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, da Comissão de 16 de dezembro. Jornal Oficial da União Europeia L338, *Comissão Económica Europeia*, Bruxelas.

Reiter, B.; Lorbeer, E. (2001). Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 881-888.

Robles-Almazan, M.; Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; Ramirez-Tortosa, C.; Rodriguez-Garcia, C.; Quiles, J.; Ramirez-Tortosa (2018). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International* 105, 654-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>

Rodriguez-Rodriguez, R. (2015). Oleonic acid and related triterpenoids from olives on vascular function: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Med Chem*. 22(11):1414-25.

Rondanini, D.; Castro, D.; Searies, P.; Rousseaux, M. (2011). Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites*, 62 (4), 399-409. <https://doi.org/10.3989/gya.125110>

Rosa, J.; Herrera, B.; Coletto, F.; Zamorano, F.; Caballero, F.; Rodríguez, E. (2006) – Agronomía y poda del olivar. Cursos modulares. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. Consejería de Agricultura y Pesca.

Rotondi, A.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Mari, M.; Lercker, G.; Toschi, T. (2004). Effect of olive ripening on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin oil. *Journal Agricultural Food Chemistry* 52, 3649-3654. <https://doi.org/10.1021/jf049845a>

Ruiz, L.; Rodríguez, A.; Fernández, M.; Márquez, A.; Pozo, M.; Bernardino, J.; Ayuso, M.; Ojeda, M. (1999) – Analistas de laboratório de almazara. 2ª Edición. Informaciones técnicas 64/99. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.

Ruíz-Gutiérrez, V.; Muriana, F.; Guerrero, A.; Cert, A.; Vilar, J (1996). Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *Journal of Hypertension* 14, 1483-1490.

Salvador, M.; Aranda, F.; Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry* 73, 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00276-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00276-4)

Salvador, M.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. (2003). Influence of extraction system, production year and área on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry* 80, 359-366. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00273-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00273-X)

Sanchez, J.; Carretero, S.; Gutierrez, F. (2001). Composicion del aceite de oliva. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Instituto Omega 3. Ed.Puleva, Granada.

Sánchez, J.; Gordillo, C.; Osorio, E.; Exposito, J.; González, C.; Cano, M. (2006). Calidad sensorial de aceites de oliva virgen procedentes de variedades de aceitunas producidas en Extremadura. *Grasas y Aceites*, 57 (3) 313-318.

Sánchez-Quesada, C.; López-Biedma, A.; Warleta, F.; Campos, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 61(50), 12173-12182. <https://doi.org/10.1021/jf403154e>

Sánchez-Rodríguez, E.; Mesa, M. (2018). Compuestos bioactivo del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*, Vol.XII (2), 80-94.

Sato, T. (1994). Application of principal component analysis on near infrared spectroscopic data of vegetable oils for their classification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71 (3), 293-298.

Scalzo, R.; Scarpati, M. (1993). A new secoiridoid from olive. Wastewaters. *Journal of Natural Products* 56(4), 621-623.

Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposito, S.; Tsticchi, A.; Montedoro, G.; Morozi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>

Servili, M.; Sordini, B.; Esposito, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Taticchi, A. (2014). Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* 3, 1-23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>

Shahidi, F.; Naczk, M. (1995). Foods phenolics. Sources, chemistry, effects, application. Technomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA.

SIMA-Sistema de informação de mercados agrícolas (2018). Acedido em Setembro, em <http://agriculturaemar.com/cotacoes-azeite-azeitona-informacao-semanal-13-19-novembro-2017/>

Singleton, V.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Smith, T. (2000). Squalene:potential chemopreventive agente. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9, 1841-1848. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.8.1841>

Sociedad Andaluza del Oleocantal (2018). Acedido em outubro em www.oleocantal.es

Solinas, M.; Marsilio, V.; Angerosa, F. (1987). Behaviour of some componentes of virgin olive oil flavour in connection with the ripening of olives. *Riv.Ital. Sost. Grasse* 64, 475-480.

Souza, V.; Fernando, A.; Pires, J.; Rodrigues, P.; Lopes, A.; Braz-Fernandes, F. (2017) Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants, *Industrial Crops and Products* 107, 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>

Souza, V.; Rodrigues, P.; Duarte, M.; Fernando, A. (2018a). Antioxidant Migration Studies in Chitosan Films Incorporated with Plant Extracts. *Journal of Renewable Materials* 6 (5), 548-558. <https://doi.org/10.7569/JRM.2018.634104>

Souza, V.; Pires, J.; Vieira, E.; Coelho, I.; Duarte, M.; Fernando, A. (2018b) Shelf life assessment of fresh poultry meat packaged in novel bionanocomposite of chitosan/montmorillonite incorporated with ginger essential oil, *Coatings* 8 (5), 177. <https://doi.org/10.3390/coatings8050177>

Souza, V.; Pires, J.; Rodrigues, P.; Lopes, A.; Braz-Fernandes, F.; Duarte, M.; Coelho, I.; Fernando, A. (2018c). Bionanocomposites of chitosan/montmorillonite incorporated with Rosmarinus officinalis essential oil: Development and physical characterization, *Food Packaging and Shelf Life* 16, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodpsl.2018.03.009>

Souza, V.; Pires, J.; Vieira, E.; Coelho, I.; Duarte, M.; Fernando, A. (2019) Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: from in vitro assays to application in fresh poultry meat, *Food Hydrocolloids* 89, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.049>

Tamendjari, A.; Angerosa, F.; Mettouchi, S.; Bellal, M. (2009). The effect of fly attack (*Bractocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlali olive oil. *Grasas y aceites* 60 (5), 507-513. <https://doi.org/10.3989/gya.032209>

Tous, J.; Romero, A. (1993). Cultivar and location effects on olive oil quality in Catalonia, Spain. *ISHS Acta Horticulturae* 356, 394-412. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.67>

Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal Food Science* 2 (10), 99-116.

Ubando-Rivera, J.; Navarro-Ocaña, A.; Valdivia-López, M. (2005). Mexican lime peel: comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. *Food Chemistry* 89, 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.076>

Uceda, M.; Hermoso, M. (1998). Obtención de aceites de calidad . II: Equipamiento y manejo de las almazaras. *Actas de los Simposios Científico-Técnicos EXpoliva*, Jaén, 337-350.

Uceda, M.; Hermoso, M. (2008). La calidad del aceite de oliva. In: El cultivo del olivo. 6ª Edición Editores científicos: Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. Junta de Andalucía- Conserjería de Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN:978-84-8476-329.1

UNESCO-Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura ((2018). acessado em 03-10-2018, em <http://pt.dietamedunesco.it/dieta-mediterranea/la-dieta-mediterranea-unesco>

Uzzan, A. (1996). The Olive and Olive Oil. In *Oils & Fats Manual - A Comprehensive Treatise*, Vol. 1. Ed. Karleskind, A.; Intercept Ltd., Hampshire, 225-231. ISBN: 1-898298-08-4.

Vaz-Freire, L.; Palma, V.; Gouveia, J.; Freitas, A. (2007). Comparação de azeites obtidos da cultivar portuguesa Galega vulgar utilizando dois métodos de extracção. *Revista de Ciências Agrárias*, 400-408. ISSN 0871-018X

Vidal, H.; Díaz, F.; López, A.; Pereira, M. (2006). Caracterización química de aceites de oliva producidos en la región de Coquimbo. *Boletín INIA* 153. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Intihuasi, La Serena Chile.

Villani, F. (2015). Valorizzazione dei componenti fenolici e polifenolici nutraceutici dell'olio d'oliva: estrazione, purificazione e sviluppo di un método analítico per l'oleaceína. Tesi di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche. Università di Pisa.

Viola, P.; Wells, W. (1997). Alignment by maximization of mutual information. *International Journal of Computer Vision* 24 (2), 137-154.

Visioli, F.; Grande S.; Bogani, P.; Galli, C. (2006). Antioxidant Properties of Olive Oil Phenolics. *Olive oil and health*. CAB International.

Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters* 468,159-160. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01216-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01216-3)

Yorulmaz, A.; Erinc, H.; Tekin, A. (2013). Changes in olive oil characteristics during maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90: 647-658. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2210-7>

Youssef, N.; Zarrouk, W.; Carrasco-Pancorbo, A.; Ouni, Y.; Segura.Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. (2010). Effect of olive ripeness on Chemicals properties and phenolic composition of Chetoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 199-204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3784>

Zafra, A.; Juárez, M.; Blanc, R.; Navalón,A.; González, J.; Vilchez, J. (2006). Determination of polyphenolic compounds in waster olive oil by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 70 (1), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.038>

ANEXO I – CARACTERÍSTICAS DO AZEITE (REGULAMENTO DE EXECUÇÃO UE 1348/2013 DE 16 DE DEZEMBRO DE 2013)

Categoria	Teor de ácidos (%)						Soma dos isómeros trans-oleicos (%)	Soma dos isómeros trans-oleicos + trans-linolénicos (%)	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenóico (%)	Beénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol (%)	Estigmasterol (%)	Betasiosterol (%) (†)	Delta-7-estigmastenol (%)		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Azeite virgem	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Azeite lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (‡)
4. Azeite refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (‡)
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(†) Teores de outros ácidos gordos (%): palmítico: 7,5 - 20,0; palmitoléico: 0,3 - 3,5; heptadecanóico: ≤ 0,3; heptadecenóico: ≤ 0,3; esteárico: 0,5 - 5,0; oleico: 55,0 - 83,0; linoleico: 3,5 - 21,0.

(‡) Soma de: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

(§) Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg ou se a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

(¶) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e se a percentagem de eritrodiol e uvaol for superior a 3,5 %.

Notas:

- Os resultados das análises devem ser expressos com um número de algarismos significativos idêntico ao previsto para cada característica. Se o algarismo seguinte for superior a 4, o último algarismo significativo deve ser aumentado de uma unidade.
- Basta que uma das características esteja fora dos limites fixados para que o produto seja classificado noutra categoria ou declarado não conforme quanto à sua pureza, para os efeitos do presente regulamento.
- O asterisco (*) associado a determinadas características de qualidade do azeite significa o seguinte:
 - no caso do azeite lampante, que os limites correspondentes podem não ser observados simultaneamente;
 - no caso dos azeites virgens, que a não observância de um dos limites correspondentes implica uma mudança de categoria, mantendo-se, porém, a classificação numa das categorias de azeites virgens.
- No caso dos óleos de bagaço de azeitona, os limites relativos às características de qualidade assinaladas com dois asteriscos (**) podem não ser observados simultaneamente.

Categoria	Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE)		Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg (‡)	Diferença entre o ECN42 determinado por HPLC e o ECN42 obtido por cálculo teórico	K ₁₃₂ (*)	K ₁₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
1. Azeite virgem extra	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ou 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg e (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Azeite lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (‡)	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (‡)	—
4. Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—

Categoria	Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE)		Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg (°)	Diferença entre o ECN42 determinado por HPLC e o ECN42 obtido por cálculo teórico	K ₁₂₂ (*)	K ₁₇₀ (*)	Delta-K (*)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (*)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (*)
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmitico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmitico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	> 350 (*)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(°) Soma dos isómeros - separáveis ou não em coluna capilar.

(*) Ou quando a mediana dos defeitos for inferior ou igual a 3,5 e a mediana do frutado igual a 0.

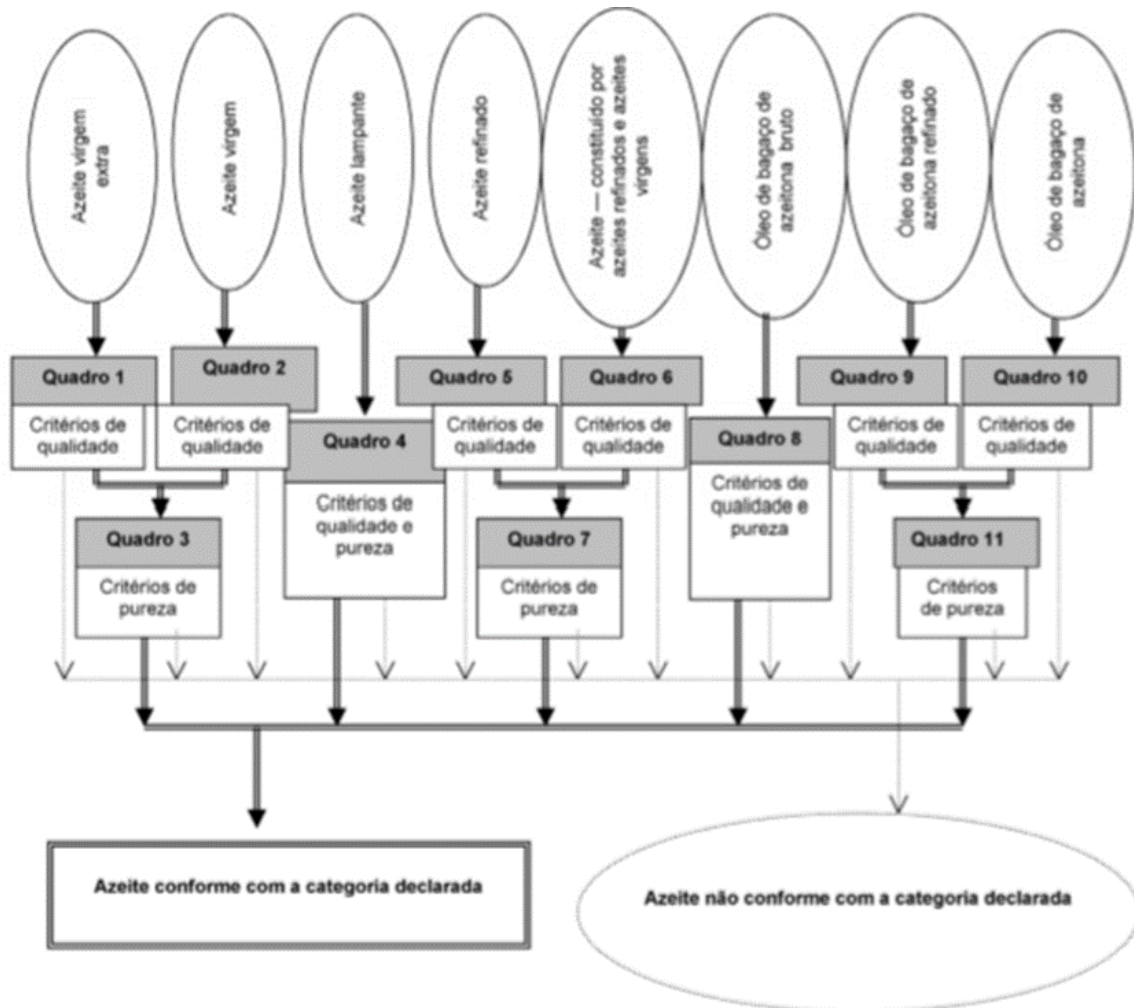
(**) Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg ou se a percentagem de eritrodíol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

(*) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e se a percentagem de eritrodíol e uvaol for superior a 3,5 %.

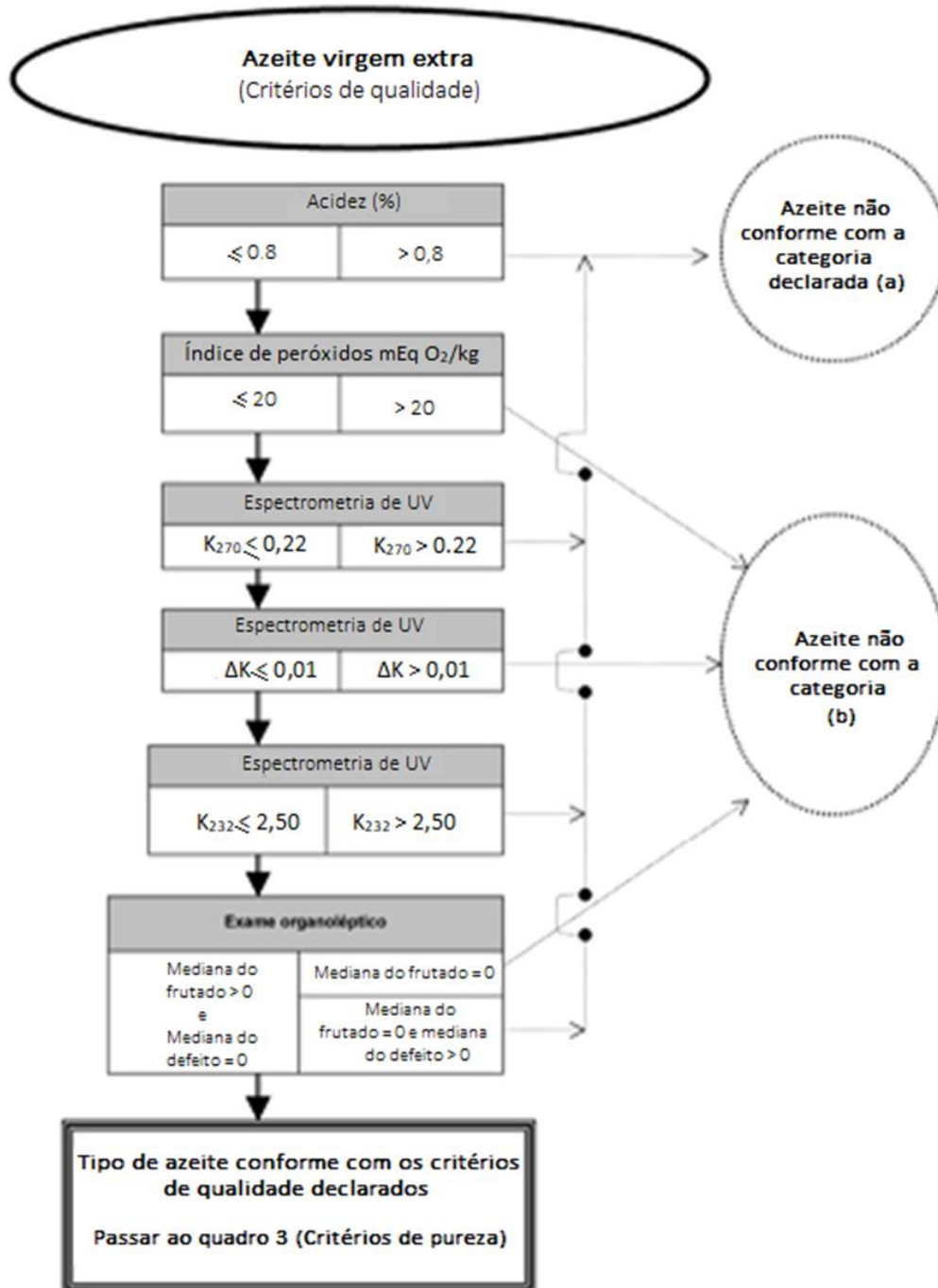
**ANEXO II - ESQUEMA DE TOMADA DE DECISÃO PARA A VERIFICAÇÃO DA CONFORMIDADE DE UMA AMOSTRA DE
AZEITE COM A CATEGORIA DECLARADA**

(REGULAMENTO DE EXECUÇÃO UE 1348/2013 DE 16 DE DEZEMBRO DE 2013)

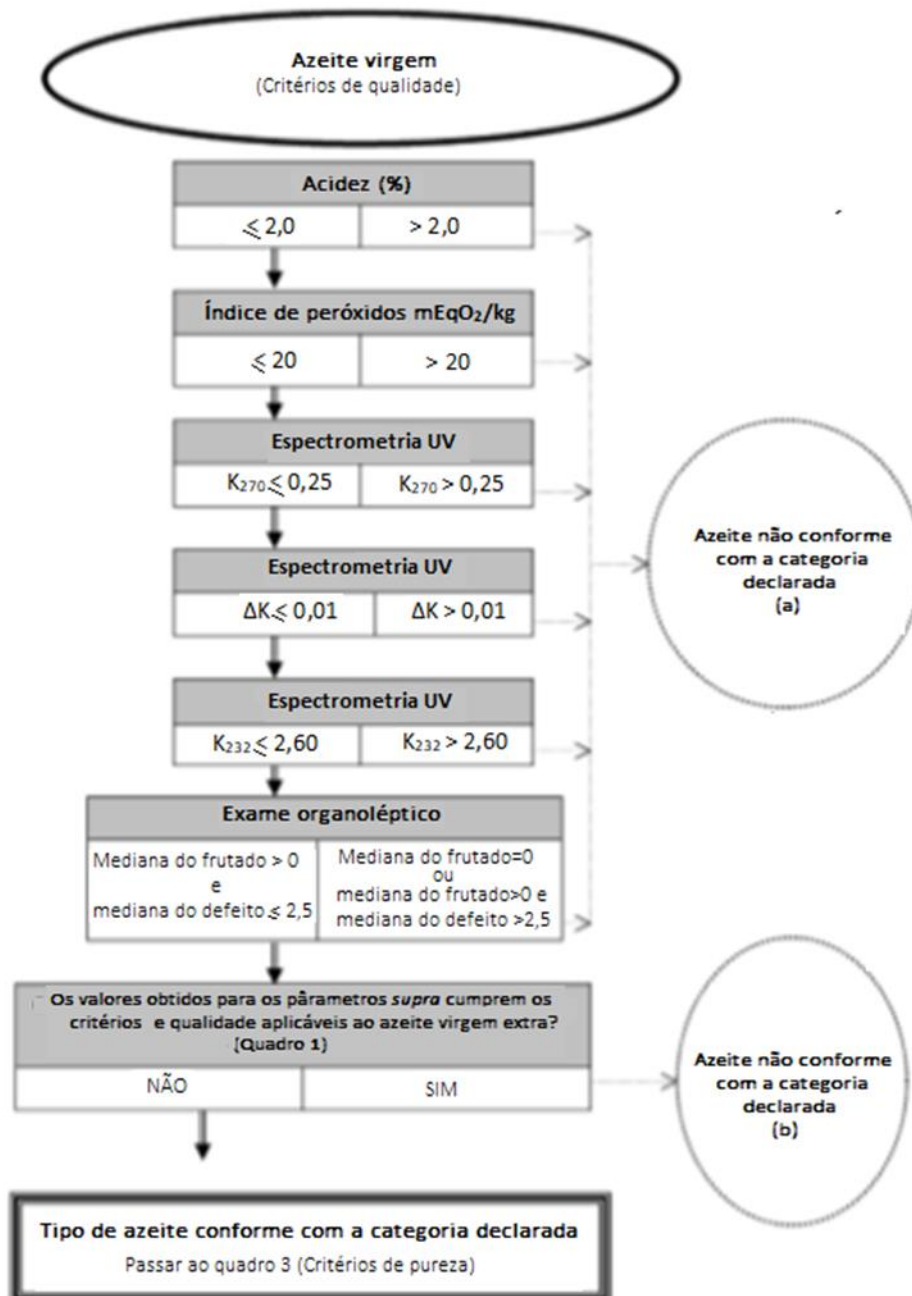
Azeite declarado como:



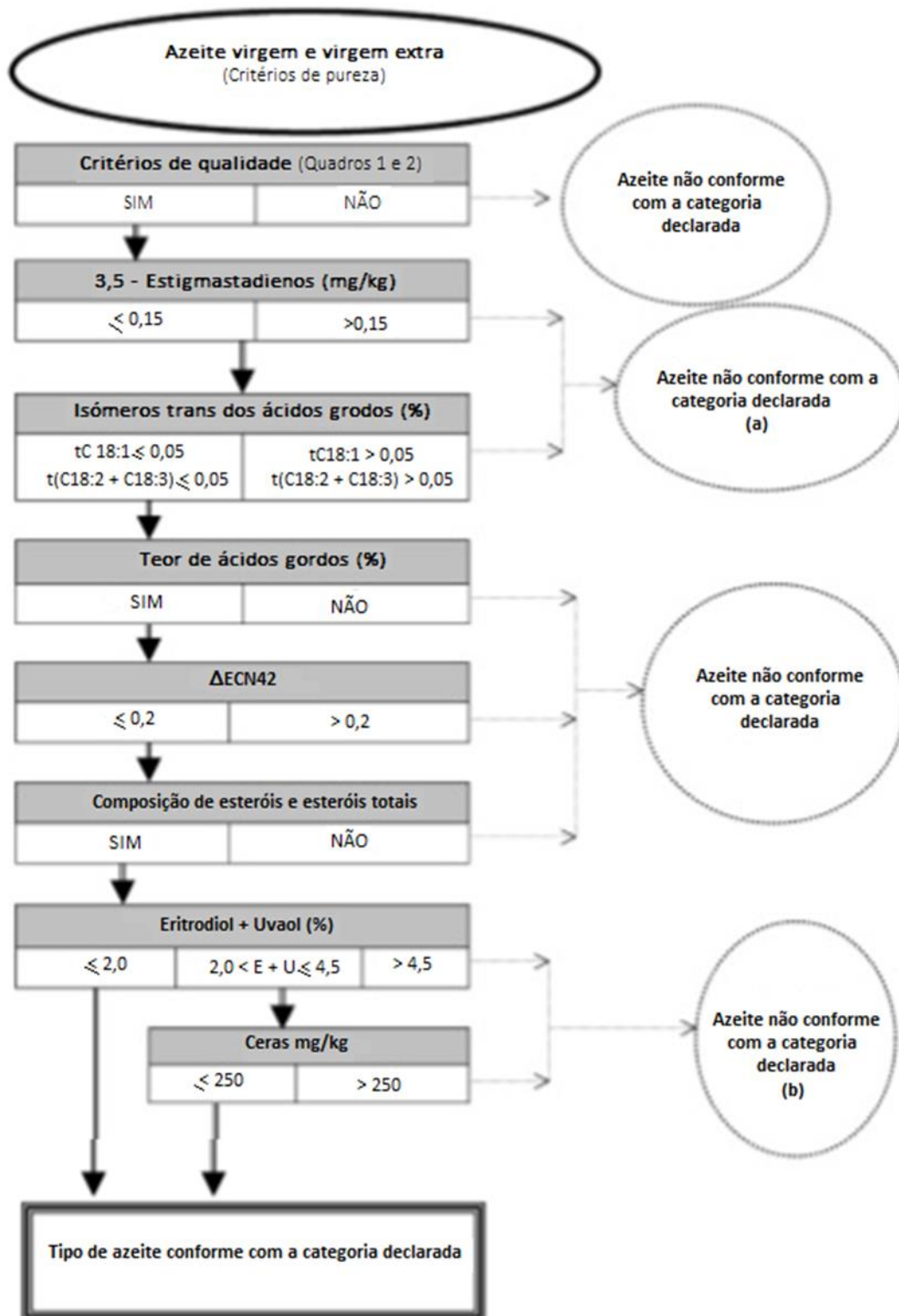
QUADRO 1



QUADRO 2



QUADRO 3



QUADRO 4

