

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**RASTREABILIDADE DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES
DAS CULTIVARES CORDOVIL DE SERPA E GALEGA VULGAR
NA REGIÃO DO ALENTEJO**

Isabel Maria Pereira Caldas Baer

**Dissertação para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Biotecnológicas**

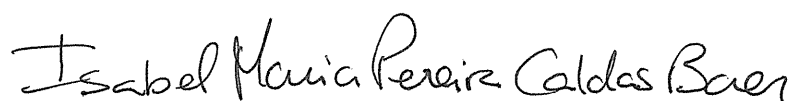
Trabalho efectuado sob orientação de:

Doutora Isabel Saraiva de Carvalho

RASTREABILIDADE DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES DAS CULTIVARES
CORDOVIL DE SERPA E GALEGA VULGAR NA REGIÃO DO ALENTEJO

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no trabalho e constam da listagem de referências incluída.



Isabel Maria Pereira Caldas Baer

Copyright© Isabel Maria Pereira Caldas Baer

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o 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

Quero expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta tese. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se uma referência especial:

À Doutora Isabel Maria Marques Saraiva de Carvalho, na qualidade de orientadora, pelo grande rigor científico, pelo sentido prático, pela exigência, pela leitura crítica do texto e pelo empenho demonstrado desde o primeiro dia.

À Doutora Silvina Ferro Palma, Diretora do Departamento de Tecnologia e Ciências Aplicadas da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja, pelo incentivo e por ter disponibilizado todos os meios necessários à execução prática deste trabalho.

A todos os meus colegas que, de uma maneira mais científica ou mais espiritual me apoiaram ao longo deste trabalho, em especial: Nuno Alvarenga, Maria João Carvalho, Natividade Costa, Anabela Durão, Patrícia Palma e Fátima Carvalho e ainda às minhas alunas Ana Pires e Daniela Freitas pelo apoio analítico prestado.

Ao Laboratório de Estudos Técnicos (LET) do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, em especial à Engenheira Paula Vasconcelos pela disponibilidade, ajuda, amizade e cedência dos meios técnicos necessários à execução de algumas análises laboratoriais.

Ao Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Baixo Alentejo e Litoral (CEBAL) pela cedência do equipamento de HPLC e muito especialmente à Doutora Conceição Fernandes pela disponibilidade e ajuda permanentes na utilização do equipamento e realização das análises.

A todos os lugares envolvidos neste projeto pela constante disponibilidade na cedência de todas as amostras de azeite necessárias à execução do trabalho: Cooperativa Agrícola de Moura e Barrancos, Cooperativa Agrícola de Beja e Brinches, Cooperativa Agrícola de Reguengos de Monsaraz, Herdade dos Coteis, Sociedade Produtora de Azeites do Alentejo e Sociedade Agrícola do Monte Novo e Figueirinha.

À minha amiga Teresa Sancho pela amizade e por todo o indispensável apoio logístico prestado.

Aos meus pais Maria Manuela e Ferdinand pelo amor, apoio, incentivo e ajuda permanentes, nos melhores e piores momentos nesta etapa da minha vida.

Finalmente aos meus filhos Margarida e Manuel pela enorme paciência e compreensão para acompanhar uma mãe sem muita disponibilidade em momentos importantes da vossa vida. Obrigada pelo vosso amor e por terem sabido manter o rumo certo durante a minha “ausência”. Foram vocês que me deram a força, coragem e serenidade necessárias, mesmo nos momentos mais difíceis, para chegar ao fim deste longo caminho.

À memória dos meus avós

RESUMO

O aumento da procura de azeites virgem extra de elevada qualidade levou ao surgimento no mercado de produtos com características específicas, com origem em determinadas regiões ou que incluem na sua composição azeitonas de uma ou várias cultivares. Além disso o recente Regulamento de Execução (EU) nº 29/2012 da Comissão, relativo às normas de comercialização do azeite, afirma a necessidade de estabelecer, a nível da União Europeia, um regime obrigatório de designação de origem, limitado ao azeite virgem extra e azeite virgem, que obedeça a condições precisas. O principal objetivo deste trabalho, dividido em dois ensaios, é contribuir para a rastreabilidade dos azeites virgens provenientes de cultivares tradicionais do Alentejo, analisando a influência da cultivar, da maturação, da região e do modo de produção nas características finais dos azeites obtidos. Conseguiu-se separar os azeites extraídos da cultivar Galega vulgar de outras cultivares e por região de proveniência com base no perfil de ácidos gordos, confirmando-se ser a origem geográfica o fator com mais peso na diferenciação da composição em ácidos gordos de um azeite. Em relação ao modo de produção, verificou-se que este fator tem poder discriminativo em azeites elementares provenientes da mesma cultivar e região. O azeite biológico proveniente da cultivar Cordovil de Serpa apresentou um índice global de qualidade inferior ao azeite convencional mas um teor de compostos fenólicos superior. Verificou-se haver uma relação entre a composição mineral do solo e a composição mineral e química dos azeites virgens.

Palavras – chave: rastreabilidade, compostos fenólicos, ácidos gordos, Galega vulgar, Cordovil de Serpa

ABSTRACT

The increased demand for high quality extra virgin olive oil has led to the emergence on the market of products with specific characteristics originating in certain regions or that include one or more olive varieties. In addition, the recent European Regulation (EU) nº 29/2012 about olive oil marketing standards, affirms the need to establish, at European Union level, a mandatory system of designation of origin, limited to the extra virgin olive oil and virgin olive oil, which meets specific conditions. The main objective of this study, divided into two trials, is to contribute to the geographical traceability of virgin olive oils from traditional Alentejo varieties, analyzing the influence of the variety, maturation, region and the production mode on the final characteristics of the obtained virgin olive oils. It was possible to separate the extracted olive oils from the Galega vulgar variety from other varieties and by region of origin based on fatty acid profile, confirming to be the geographical origin the factor with more weight in the differentiation of the fatty acids composition of an olive oil. Regarding to the production method, it was found that this factor has discriminative power in virgin olive oils obtained from the same variety and region. The organic olive oil from the Cordovil de Serpa olive variety presented a lower quality index in relation to the conventional oil but a higher phenolic compounds content. There was a relationship between the mineral composition of the soil and chemical and mineral composition of virgin oils.

Key – words: Traceability, phenolic compounds, fatty acids, Galega vulgar, Cordovil de Serpa

PREÂMBULO

A oliveira, árvore nativa da região do Mediterrâneo, é actualmente largamente cultivada em muitas outras partes do mundo para a produção de azeitona de mesa e azeite. O azeite virgem, extraído mecanicamente do fruto, é muito popular devido ao seu potencial nutritivo e promotor da saúde, possuindo um elevado conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados e outros compostos menores como compostos fenólicos, fitosteróis, tocoferóis, carotenoides, clorofila e esqualeno. A cultivar, região de produção, época de colheita e a tecnologia de extração são alguns dos factores que influenciam a composição da azeitona e do azeite virgem (Ghanbari *et al*, 2012).

A exigência por parte dos consumidores na identificação geográfica dos alimentos resultou na Regulação Europeia que estabelece a rotulagem controlada dos produtos baseada na identificação geográfica tendo, em 2009 os Estados membros da União Europeia acordado na exigência da colocação da origem no rótulo dos azeites virgem e virgem extra (Regulamento CE nº 182/2009). Para reforçar esta legislação deve-se analisar a autenticidade das amostras, provando a presença/ausência de adulterantes ou verificando a origem geográfica ou a cultivar, através da comparação com amostras conhecidas de confiança (Perri *et al*, 2012). De facto, Ghanbari *et al* (2012) referem que a Grécia é o 3º produtor mundial de azeite virgem, exportando cerca de metade da sua produção; no entanto, apenas 5% do produto embalado reflete a sua origem no rótulo da embalagem.

O principal objetivo deste trabalho é contribuir para a rastreabilidade geográfica dos azeites virgens provenientes de cultivares típicas do Alentejo, analisando a influência da cultivar, da maturação, do modo de produção e da região – nomeadamente da composição dos solos – nas características finais dos azeites obtidos.

O trabalho apresenta-se estruturado em sete capítulos independentes, divididos em sub-capítulos. Ao primeiro capítulo introdutório segue-se o capítulo dois que apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas desenvolvidos na parte experimental do trabalho. Faz-se inicialmente uma abordagem ao sector mundial e nacional do azeite em relação à evolução da produção e consumo nos últimos anos.

Caracterizam-se as principais cultivares no Alentejo onde se incluem as cultivares Galega vulgar e Cordovil de Serpa, objecto de estudo neste trabalho e descreve-se a azeitona, especialmente em relação à composição e mecanismo da biossíntese dos principais ácidos gordos e compostos antioxidantes e à sua evolução durante o crescimento e maturação dos frutos. Caracteriza-se depois a composição química do azeite virgem em relação à sua diferenciação na composição em ácidos gordos, de acordo com a cultivar e origem geográfica, comparando os limites com o estabelecido na legislação. Entre os componentes menores ou fração insaponificável do azeite virgem encontram-se os compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes que merecem destaque neste capítulo por serem uma das componentes principais em estudo nos ensaios realizados. Por fim referem-se ainda os benefícios desta composição na saúde e aborda-se o tema da rastreabilidade geográfica, destacando-se a recente legislação europeia e descrevendo-se as três Denominações de Origem Protegidas existentes no Alentejo.

O capítulo três descreve os métodos e materiais utilizados nas análises efetuadas nos ensaios experimentais. Realizaram-se as análises percentagem de acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos (K232 e K270), constantes na legislação, com o objectivo principal de comprovar a classificação das amostras com a categoria de azeite virgem extra e ainda, no segundo ensaio, perceber a influência dos diferentes modos de produção nas características do azeite obtido ao longo da maturação. A análise da cor das azeitonas, através do índice de maturação de Jaen permitiu classificar as amostras em verdes ou maduras e estabelecer comparações entre os azeites obtidos das azeitonas ao longo do seu período de maturação. O mecanismo envolvido na biossíntese dos ácidos gordos depende da informação genética de cada cultivar sendo a resposta variável de acordo com as condições edafo-climáticas como temperatura, latitude, água disponível e características do solo, sendo, assim, a análise da sua composição relativa essencial na determinação da origem geográfica de azeites virgens extraídos da mesma cultivar. Os compostos antioxidantes como os compostos fenólicos, os tocoferóis e, em certa medida, os pigmentos clorofilinos e carotenoides são muito variáveis, dependendo não só da cultivar mas também do modo de condução do olival, estado de maturação das azeitonas e de todo o processo tecnológico de extração e armazenamento do azeite virgem pelo que será, à partida,

difícil estabelecer uma relação entre o seu conteúdo e a origem de um determinado azeite virgem. No entanto, a activação das enzimas responsáveis pela síntese destes compostos depende fortemente do stress hídrico e nutricional a que estão sujeitas as oliveiras, sendo possível, em igualdade de outros factores, relacionar a composição em compostos antioxidantes de um azeite virgem e a composição mineral do solo que lhe deu origem, o que justifica as análises realizadas nos ensaios descritos neste trabalho.

No primeiro ensaio faz-se também a análise mineral das amostras de azeite virgem.

O capítulo quatro descreve o tratamento estatístico aplicado na análise dos dados obtidos nos ensaios. Em ambos os ensaios aplicaram-se, inicialmente, métodos de estatística descritiva e análise de variância que permitiram verificar, após determinação dos valores médios e respectivos desvios-padrão, a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos nas diferentes determinações analíticas efectuadas, o que justifica a diferenciação entre amostras. Devido à existência de inúmeras variáveis analisadas em cada amostra o que tornaria difícil a sua comparação em tabelas, foi realizada a análise multivariada dos dados, através da análise em componentes principais. Esta técnica permite reconhecer correlações existentes entre variáveis estabelecendo grupos de amostras com comportamento semelhante, em que a semelhança entre amostras é representada pela sua distância euclidiana no espaço. No primeiro ensaio foi ainda utilizado o teste de correlação de Pearson, que mede o grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas, para verificar a possível relação entre a composição mineral dos solos e a dos respectivos azeites virgens e bagaços de azeitona obtidos.

Os capítulos cinco e seis referem-se aos ensaios realizados: “Caracterização de azeites virgens provenientes da cultivar Galega vulgar em relação a outras cultivares e à origem geográfica” e “Azeite virgem biológico vs convencional: variação ao longo da maturação para a cultivar Cordovil de Serpa”, descritos a seguir neste capítulo.

O sétimo capítulo apresenta as conclusões gerais do trabalho e no final encontra-se referida a bibliografia consultada.

A parte experimental do trabalho foi organizada em dois ensaios, descritos nos capítulos cinco e seis deste trabalho. No primeiro ensaio as amostras de azeite virgem foram obtidas em lagares industriais de extração centrífuga de duas fases, a fim de aproximar as condições experimentais do trabalho com as condições reais atuais de colheita e extração de azeite virgem. O ensaio foi dividido em duas partes: na primeira parte analisou-se a composição média em ácidos gordos de azeites virgem extra obtidos de diferentes cultivares de azeitona em olivais situados nas regiões Norte, Centro e Sul do país durante três campanhas (2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012) e, na campanha 2011/2012, especificou-se a análise para a cultivar Galega vulgar. Na segunda parte do ensaio, com o intuito de aprofundar o tema da rastreabilidade geográfica, restringiu-se a área em análise ao Alentejo e procedeu-se à obtenção e análise de amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação e obtidas em lagares situados nas margens esquerda e direita do rio Guadiana. As amostras foram obtidas na mesma campanha (2012/2013) e manteve-se o modo de produção: tradicional de regadio. Analisou-se essencialmente a variação na composição em ácidos gordos e em antioxidantes como compostos fenólicos e tocoferóis e verificou-se a relação entre a composição mineral dos solos e a composição mineral dos respectivos azeites.

No segundo ensaio acompanhou-se a maturação dos frutos da cultivar Cordovil de Serpa na campanha 2011/2012, em dois olivais situados no concelho de Moura, extraíndo-se o azeite semanalmente durante dez semanas. Manteve-se a zona geográfica e o método de extração (Abencor) e variou-se o modo de produção: biológico *versus* tradicional de regadio. O objectivo foi verificar as diferenças na composição dos azeites obtidos, essencialmente em relação à composição em antioxidantes e ácidos gordos e relacioná-la com a composição em compostos minerais vestigiais dos solos. Esta cultivar é tradicional na região de Moura e contribui com cerca de 40% para a composição do azeite virgem DOP Moura.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
PREÂMBULO.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	5
2.1 – O SECTOR MUNDIAL E NACIONAL DO AZEITE	5
2.2 – PRINCIPAIS CULTIVARES DE AZEITONA NO ALENTEJO	9
2.2.1 – Cultivar Galega Vulgar	10
2.2.2 – Cultivar Cobrançosa.....	11
2.2.3 – Cultivar Cordovil de Serpa.....	11
2.2.4 – Cultivar Verdeal Alentejana.....	12
2.2.5 – Cultivar Carrasquenha	12
2.2.6 – Cultivar Redondil	12
2.3 – A AZEITONA	13
2.3.1 – Composição	13
2.3.2 – Maturação	15
2.3.2.1 – Crescimento da azeitona.....	16
2.3.2.2 – Biossíntese dos ácidos gordos e triacilgliceróis.....	17
2.3.2.3 – Alterações nos principais componentes do azeite na azeitona	19
2.4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE	24
2.4.1 – Fração saponificável	24
2.4.2 - Fração insaponificável	30
2.4.3 – Composição em antioxidantes de azeites virgens extraídos de diferentes cultivares	39
2.5 – O AZEITE E A SAÚDE	40
2.6 – A RASTREABILIDADE DO AZEITE VIRGEM	43
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 – ÍNDICE DE MATURAÇÃO DOS FRUTOS	53
3.2 – PERCENTAGEM DE ACIDEZ	55

3.3 – ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	55
3.4 – ÍNDICES ESPECTROFOTOMÉTRICOS (K232 e K270)	56
3.5 – VISCOSIDADE	57
3.6 – PIGMENTOS.....	57
3.8 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	59
3.9 – COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS	61
3.10 – TOCOFERÓIS (ALFA, BETA E GAMA)	64
3.11 – ÁCIDOS GORDOS	66
3.12 – ANÁLISE DE ELEMENTOS VESTIGIAIS EM AMOSTRAS DE SOLO, AZEITE VIRGEM E BAGAÇO DE AZEITONA.....	67
3.13 – ANÁLISE QUÍMICA DE SOLOS	69
CAPÍTULO 4 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO	71
4.1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE DE VARIÂNCIA A UM FACTOR	71
4.2 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS.....	72
4.2.1 – Análise em componentes principais.....	72
4.3 – CORRELAÇÃO DE PEARSON	73
CAPÍTULO 5 – CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES DA CULTIVAR GALEGA VULGAR EM DIFERENTES REGIÕES DO PAÍS (ENSAIO 1).....	75
RESUMO	75
5.1 – INTRODUÇÃO	76
5.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	79
5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.3.1 – Composição ácida de azeites virgens extraídos das cultivares Arbequina, Blanqueta, Cobrançosa, Cordovil de Serpa, Galega vulgar e picual.....	85
5.3.2 – Composição ácida de azeites virgens extraídos da cultivar Galega vulgar provenientes de olivais do Norte, Centro e Sul do país	89
5.3.3 – Caracterização química de azeites virgens extraídos da cultivar Galega Vulgar nos estados de maturação verde e maduro provenientes das margens esquerda e direita do rio Guadiana	96
5.3.4 – Rastreabilidade geográfica dos azeites virgens extraídos da cultivar Galega vulgar nas duas margens do rio Guadiana através da composição mineral elemental.....	115
5.4 – CONCLUSÕES.....	128
CAPÍTULO 6 – AZEITE VIRGEM BIOLÓGICO VS CONVENCIONAL: VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO AO LONGO DA MATURAÇÃO PARA A CULTIVAR CORDOVIL DE SERPA (ENSAIO 2).....	131
RESUMO	131
6.1 – INTRODUÇÃO	132

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	138
6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
6.3.1 – Determinação da cor das azeitonas (índice de Jaen) ao longo da maturação	142
6.3.2 – Caracterização química das amostras de azeite virgem	144
6.3.3 – Relação entre a composição mineral dos solos e a composição em ácidos gordos e antioxidantes dos azeites.....	165
6.4 – CONCLUSÕES.....	174
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÃO	179
BIBLIOGRAFIA.....	185

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Produção de azeite na União Europeia (X 1000 ton) (COI, 2015).....	6
Tabela 2 Azeitona laborada e azeite extraído pelos lagares e por região na campanha 2014-2015, de outubro de 2014 a Janeiro de 2015 (GPP, 2015)	7
Tabela 3 Nome, fórmula química e limites dos ácidos gordos existentes no azeite	26
Tabela 4 Perfil ácido de azeites virgens provenientes de diferentes cultivares e origens geográficas	29
Tabela 5 Composição em antioxidantes de azeites virgens provenientes de diferentes cultivares e origens geográficas	40
Tabela 6 Gradiente de solventes utilizados na análise de HPLC	63
Tabela 7 Codificação das amostras de azeite virgem provenientes da cultivar Galega vulgar com base na região de proveniência e modo de produção.....	81
Tabela 8 Codificação das amostras de azeite virgem extra extraídas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação em lagares das margens esquerda e direita do rio Guadiana ..	83
Tabela 9 Composição percentual (média e desvio padrão) em ácidos gordos das cultivares picual, Galega, Cordovil, Blanqueta, Arbequina e Cobrançosa em várias regiões do país durante três campanhas	86
Tabela 10 Composição percentual (média e desvio padrão) em ácidos gordos das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar nas regiões Norte (N), Centro (C) e Sul (S) ...	90
Tabela 11 Valores próprios e extração dos componentes principais	92
Tabela 12 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais	93
Tabela 13 Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas.....	97
Tabela 14 Caracterização química (continuação): valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas.....	98
Tabela 15 Caracterização ácida percentual: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras	99
Tabela 16 Valores próprios e extração dos componentes principais	112
Tabela 17 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais	113
Tabela 18 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes solos (mg/Kg).	116

Tabela 19 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes azeites (10 X mg/Kg)	117
Tabela 20 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes bagaços de azeitona (mg/Kg)..	118
Tabela 21 Valores próprios e extração dos componentes principais	120
Tabela 22 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais	121
Tabela 23 Valores próprios e extração dos componentes principais.	124
Tabela 24 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais	125
Tabela 25 Resultados da correlação de Pearson entre a composição elemental do solo e do azeite referente às amostras estudadas (N=18).	128
Tabela 26 Variação percentual (média e desvio padrão) dos principais ácidos gordos e relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) nas amostras de azeite das diferentes cultivares e para os dois estados de maturação.....	134
Tabela 27 Índices de maturação das azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa produzidas nos modos de produção biológico e convencional, de acordo com as datas de colheita.....	142
Tabela 28 Caracterização da evolução química (média e desvio-padrão) das amostras de azeite virgem biológico e convencional ao longo da maturação da cultivar Cordovil de Serpa	145
Tabela 29 Composição percentual dos ácidos gordos (média e desvio-padrão) de amostras de azeite virgem extraídas de azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa, produzidas em modo de produção biológico (B) e em modo de produção convencional (C) durante a maturação.....	155
Tabela 30 Valores próprios e extração dos componentes principais.	161
Tabela 31 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais	162
Tabela 32 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância da composição média do solo de em função do modo de produção (convencional e biológico); correlações de Pearson entre a composição do solo e os constituintes do azeite de maturação média	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Evolução recente na extração de azeite em Portugal e tendência estimada para o horizonte 2020 (Casa do Azeite, 2013)	6
Figura 2 Evolução recente das exportações e tendência para o horizonte 2020 (Casa do Azeite, 2015)	8
Figura 3 Principais compostos fenólicos presentes na azeitona.....	15
Figura 4 Estrutura química das moléculas de β -caroteno e clorofila a.....	37
Figura 5 Estrutura química dos tocoferóis α , β , γ e δ	39
Figura 6 Distribuição dos atributos no plano	94
Figura 7 Projeção das amostras de azeite virgem provenientes das diferentes regiões do país no plano principal.....	94
Figura 8 Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos parâmetros polifenóis totais, hidroxitirosol, oleuropeína e tocoferóis alfa, beta e gama das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes e maduras	105
Figura 9 Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos parâmetros clorofila, carotenóides, estabilidade oxidativa (rancimat) e relação AGMI/AGPI das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes e maduras..	107
Figura 10 - Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos principais ácidos gordos das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes e maduras.	109
Figura 11 Distribuição dos atributos no plano	114
Figura 12 Projeção das amostras nos dois estados de maturação e nos dois locais no plano principal.....	114
Figura 13 Distribuição dos atributos no plano principal	122
Figura 14 Projeção das amostras de solos dos olivais situados nas seis freguesias no plano principal. Freguesias de S. João Baptista, Sto. Agostinho e Salvador na margem esquerda e freguesias de S. Brissos, Santiago Maior e Reguengos de Monsaraz na margem direita.....	122
Figura 15 Distribuição dos atributos no plano principal	126
Figura 16 Projeção das amostras de azeite virgem obtidas a partir das azeitonas produzidas nos olivais situados nas seis freguesias das margens esquerda e direita do rio Guadiana, no plano principal.....	126
Figura 17 Evolução do índice de maturação (índice de Jaen) para as azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa, produzidas em modo de produção biológico e em modo de produção	

convencional durante 10 semanas, entre os dias 13 de Outubro e 20 de Dezembro de 2011)	144
Figura 18 Variação da percentagem de acidez (%) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	146
Figura 19 Variação do índice de peróxidos com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	147
Figura 20 Variação dos índices espectrofotométricos (K270 e k232) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	148
Figura 21 Variação do teor de compostos fenólicos totais com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	149
Figura 22 Variação do teor de compostos fenólicos individuais (tirosois e hidroxitirosois) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	150
Figura 23 Evolução do teor de tocoferóis α , β e γ com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos e convencionais extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.	153
Figura 24 Evolução dos principais ácidos gordos durante a maturação de azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa produzida nos modos de produção biológico e convencional	158
Figura 25 Estabilidade oxidativa, medida pelo rancimat (horas) e relação AGMI/AGPI das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Cordovil de Serpa, durante a maturação das azeitonas produzidas em modo de produção biológico e convencional	159
Figura 26 Distribuição dos atributos no plano	163
Figura 27 Projeção das amostras nos dois modos de produção ao longo da maturação no plano principal	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Análise em Componentes Principais

AD – Análise Discriminante

AGMI – Ácidos Gordos Monoinsaturados

AGPI – Ácidos Gordos Polinsaturados

CEBAL – Centro de Biotecnologia do Alentejo

CEPAAL – Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo

COI – Conselho Oleícola Internacional

CP1 – Componente Principal 1

CP2 – Componente Principal 2

DOP – Denominação de Origem Protegida

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IM – Índice de Maturação

K232 – Índice espectrofotométrico a 232 nm

K270 – Índice espectrofotométrico a 270 nm

LET – Laboratório de Estudos Técnicos

LVA – Laboratório de Vinho e Azeite

MUFA – Mono Unsaturated Fatty Acids

PUFA – Poly Unsaturated Fatty Acids

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) iniciou-se quatro mil anos a.C. próximo do Mar Morto, região que abrange a Síria, Líbano e Israel, expandindo-se para o Ocidente pela bacia do Mediterrâneo. Atualmente é cultivada em todos os continentes, embora a região com maior produção mundial seja a Europa (Costa, 2012).

Rabiei *et al* (2012) referem que a área de cultura da oliveira se situa entre as latitudes 30º e 45º a norte e sul do Equador, embora na Austrália existam olivais recentemente plantados com sucesso mais perto do Equador, em latitudes inferiores a 30º, o que se deve provavelmente à altitude ou outras razões geográficas.

A região mediterrânica caracteriza-se pela existência de frequentes períodos de seca, elevadas temperaturas e forte radiação solar, fatores que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento das azeitonas. A capacidade de adaptação da oliveira às alterações ambientais torna-se, assim, essencial para o seu crescimento e sobrevivência (Ramalheiro, 2009).

São cultivadas cerca de 1275 diferentes cultivares de azeitona em todo o mundo. No entanto, o número é muito menor quando se analisa a importância das cultivares considerando parâmetros como a produção e o consumo. Existem várias cultivares das quais se extraem apenas algumas centenas de hectolitros de azeite que são muitas vezes vendidos em pequenas áreas geográficas e consumidos localmente. Assim, só algumas dezenas de azeites monovarietais ou elementares são economicamente interessantes, embora todos tenham interesse científico (Aparício *et al*, 2002).

A extração de azeite virgem é uma das atividades agrícolas mais características da região mediterrânica e de relevante importância para a economia da maioria dos países desta zona. Ao longo dos anos têm-se aperfeiçoado as formas de produção de diferentes cultivares de azeitonas, com o objetivo de satisfazer as necessidades e gostos de diferentes consumidores. A crescente necessidade no sentido da qualidade, associada ao cada vez mais notório papel do azeite na nutrição e saúde humanas, tem

vindo a pressionar a tecnologia de extração deste sumo no sentido de cada vez mais evitar que as suas qualidades intrínsecas sejam alteradas (Salvador *et al.*, 2001).

Os recentes investimentos no sector, principalmente no Alentejo, na zona de influência da barragem de Alqueva, vieram confirmar as potencialidades edafo-climáticas e socio-económicas de Portugal em relação a esta cultura, incentivando à sua modernização e expansão. É uma cultura com grande tradição e importância determinante em vastas áreas do país, sendo uma mais valia para as regiões e populações onde se encontra (Costa, 2012).

As condições edafo-climáticas adaptadas à cultura e a sua localização em todo o território, com manchas relevantes em algumas regiões e com importante diversidade de cultivares, potenciam os requisitos para a extração de azeite virgem de qualidade (Costa, 2012).

A abundância de germoplasma indígena garante a obtenção de azeites virgem extra de alta qualidade, contribuindo para a preservação de grande parte da tradicional biodiversidade genética da azeitona. O conhecimento das características específicas dos azeites virgem extra elementares conduzem a um conhecimento mais profundo das regiões onde estes azeites são extraídos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do setor do turismo (Rotondi *et al.*, 2013).

As mais recentes mudanças no comportamento dos consumidores em relação aos hábitos de consumo estão marcadamente afetadas pelo seu crescente interesse em alimentos com uma designação geográfica de confiança. Em relação ao azeite virgem esta informação é uma garantia adicional da sua qualidade, autenticidade, tipicidade e segurança. Assim, a identificação geográfica torna-se uma ferramenta para assegurar a proteção do consumidor, particularmente em relação aos azeites virgem extra, uma vez que a sua qualidade está fortemente relacionada com as cultivares utilizadas e as suas condições ambientais de crescimento (Garcia-González *et al.*, 2009; Perri *et al.*, 2012).

A exigência por parte dos consumidores na identificação geográfica dos alimentos resultou na Regulação Europeia que estabelece a rotulagem controlada dos produtos

baseada na identificação geográfica (Garcia-González *et al*, 2009; Carrasco-Pancorbo *et al*, 2009), sendo as Denominação de Origem Protegida (DOP) e Indicação Geográfica Protegida (IGP) classificações oficiais da União Europeia utilizadas para a definição da genuinidade e da qualidade dos azeites virgens (Benincasa *et al*, 2007).

Em 2009, os Estados membros da União Europeia acordaram na exigência da colocação da origem no rótulo dos azeites virgem e virgem extra (Regulamento CE nº 182/2009). Para reforçar esta legislação deve-se analisar a autenticidade das amostras, provando a presença/ausência de adulterantes ou verificando a origem geográfica ou a cultivar, através da comparação com amostras conhecidas de confiança (Perri *et al*, 2012).

A qualidade é um fator fundamental de aumento da confiança dos consumidores e da consolidação do consumo na União Europeia e em países terceiros. Todavia, a melhoria da qualidade do azeite virgem exige o envolvimento de todos os intervenientes nos processos de extração, comercialização e legislação. Por outro lado, a qualidade pressupõe o conhecimento das propriedades físico-químicas e organolépticas do produto e dos parâmetros que determinam as suas características. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias analíticas mais expeditas para a caracterização das diferentes cultivares existentes ou para a deteção de adulterações constitui uma mais valia para a valorização dos azeites virgens (Costa, 2012).

Os efeitos benéficos para a saúde atribuídos ao azeite virgem e o desenvolvimento da indústria de extração de azeite virgem, intensificaram a procura de nova informação e estimularam vastas áreas de investigação (Rabiei *et al*, 2012).

A análise instrumental deve permitir a rastreabilidade geográfica ou a determinação *a posteriori* da origem geográfica de uma amostra desconhecida através de parâmetros químicos. Devido às várias características que estão associadas com uma determinada região, como por exemplo, o solo, o clima, a altitude e que afetam a caracterização química dos azeites virgens, a rastreabilidade geográfica baseada numa caracterização química detalhada parece ser a aproximação mais eficiente para atingir este objetivo (Garcia-González *et al*, 2009).

Rabiei *et al* (2012) reforça esta ideia afirmando que a composição química do azeite virgem é influenciada por fatores genéticos (cultivar) e ambientais (condições edafo-climáticas), pelo que a região de produção das azeitonas é altamente responsável pelas características específicas de cada azeite virgem.

CAPÍTULO 2 – CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

2.1 – O SECTOR MUNDIAL E NACIONAL DO AZEITE

Cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, Grécia, Portugal e França) são responsáveis por cerca de 70% da produção a nível mundial. Os outros principais países produtores são a Tunísia (8,1%), a Turquia (7,2%), a Síria (7,3%), Marrocos (3,7%) e a Argélia (2,1%) (Casa do Azeite, 2013).

A produção nacional de azeite satisfaz cerca de 50 a 60% das necessidades de aprovisionamento do nosso país. Os restantes 40 a 50% são assegurados pela entrada de azeite com proveniência comunitária, sendo Espanha a sua principal fonte de abastecimento. O consumo de azeite tem vindo a aumentar a nível mundial, sendo uma boa aposta para as exportações nacionais. Com a implantação de novos olivais nos últimos anos, prevê-se um aumento da produção oleícola, caminhando-se a bom passo para a auto-suficiência (CONFAGRI, 2013).

Ao longo das últimas 15 campanhas verificou-se uma taxa de crescimento média da produção mundial de azeite de 0,9%. Ao nível da União Europeia, a produção de azeite tem crescido significativamente nos últimos anos, sendo que Espanha ocupa atualmente o 1º lugar no ranking mundial dos países produtores com mais de 40% da produção mundial seguindo-se a Itália com 29% e os países da margem esquerda do Mediterrâneo com 15% (Casa do Azeite, 2013). Portugal é responsável por cerca de 3% da produção de azeite da União Europeia e 2% da produção mundial.

Na tabela 1 apresenta-se a evolução da produção de azeite entre as campanhas 2008/2009 e 2014/2015 para os principais países produtores europeus.

Tabela 1 Produção de azeite na União Europeia (X 1000 ton) (COI, 2015)

Campanha	Espanha	Itália	Grécia	Portugal	França	Chipre	Eslóvenia
08/ 09	1 030	540	305	53	7	3	0,5
09/ 10	1 402	430	320	63	6	4	0,7
10/ 11	1 392	440	301	63	6	7	0,7
11/ 12	1 614	450	295	76	3	6	0,5
12/ 13	608	490	360	69	4	6	0,7
13/ 14*	1 775,8	461,2	131,9	91,8	4,9	5,8	0,6
14/ 15*	825,7	302,5	300,0	61,2	5,0	5,8	0,2

*estimativa

Em Portugal tem-se assistido, nos últimos anos, a uma recuperação da produção, após o acentuado decréscimo verificado sobretudo a partir da década de 60 até finais da década de 80, onde passámos de uma produção da ordem das 90 000 toneladas na década de 50 para valores médios de cerca de 35 000 toneladas nos anos 80.

Na figura 1 pode observar-se a estimativa da tendência da evolução da produção de azeite virgem em Portugal até 2020.

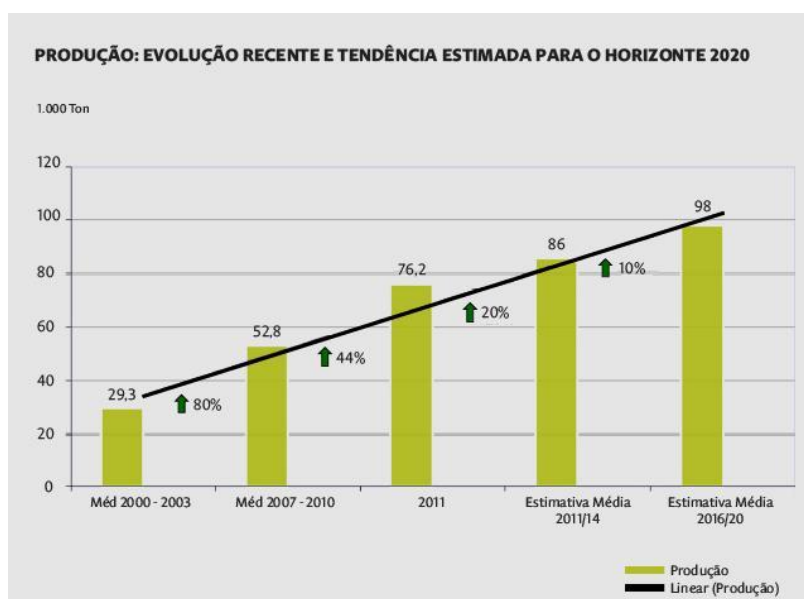


Figura 1 Evolução recente na extração de azeite em Portugal e tendência estimada para o horizonte 2020 (Casa do Azeite, 2013)

Portugal produziu 91,8 toneladas de azeite na campanha 2013/ 2014, mais 42% que a média dos cinco anos anteriores. O crescimento médio nos próximos três anos deverá ser da ordem dos 20%, sendo que de 2016 a 2020 o setor deverá continuar a crescer, embora a um ritmo mais moderado - da ordem dos 10% ao ano. Desde finais dos anos

sessenta que Portugal não produzia tanto azeite, sendo de esperar, segundo os especialistas do setor, que dentro de um/dois anos o país volte a ser auto suficiente neste domínio. Nas campanhas 2012/ 2013 e na actual houve uma quebra acentuada na produção de azeite, principalmente em Espanha e Portugal, devido a condições meteorológicas e fitossanitárias desfavoráveis para a produção de azeitona, principalmente nos olivais tradicionais de sequeiro que ainda representam cerca de 80% da área total nacional de olival para azeite.

A azeitona para azeite encontra em Portugal as condições adequadas para o desenvolvimento de azeite de qualidade que é reconhecido no exterior pelas suas características e especificidade, reunindo inúmeros prémios internacionais. Ainda assim, apesar do azeite DOP ser ainda pouco significativo, com uma quota de, aproximadamente, 3% no total, no qual se incluem seis azeites DOP, mais de 80% do azeite é do tipo virgem-extra. O ano de 2011 foi uma exceção, com 76% deste tipo de azeite, no entanto, em termos absolutos, a produção de azeite virgem extra atingiu o valor mais elevado dos últimos anos.

Em relação à distribuição da produção em Portugal pode observar-se na tabela 2 que, na presente campanha, 2014 – 2015, e de acordo com dados do Sistema de Informação sobre o Azeite e Azeitona de Mesa (SIAZ) divulgados pelo Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP) do Ministério da Agricultura (www.gpp.pt) a azeitona laborada para azeite foi de 359 mil toneladas, das quais 243 toneladas no Alentejo.

Tabela 2 Azeitona laborada e azeite extraído pelos lagares e por região na campanha 2014-2015, de outubro de 2014 a Janeiro de 2015 (GPP, 2015)

Região	Lagares	Azeitona laborada	Azeite extraído		Rendimento médio
	Nº	Kg	Kg	%	%
Norte	58	73 365 168	10 774 311	21,0	14,6
Centro	39	22 988 588	2 737 868	5,3	11,9
Lisboa e Vale do Tejo	16	17 357 405	2 070 685	4,0	11,9
Alentejo	51	243 249 121	35 358 351	69,1	14,5
Algarve	4	1 786 890	249 032	0,5	13,9
TOTAL	168	358 947 172	51 190 247	100	14,3

De acordo com a Casa do Azeite (2015), na média das três últimas campanhas, a União Europeia, com 66%, e a Tunísia, com 18%, foram os principais países exportadores de azeite. Entre os principais importadores encontram-se os países considerados os novos consumidores de azeite, que no seu conjunto foram responsáveis por cerca de 68% das importações mundiais: os Estados Unidos (38%), o Brasil (9%), a Austrália (4%), o Canadá (5%), o Japão (6%) e a China (6%). Portugal é, tradicionalmente, um país com vocação exportadora, sendo o 3º maior exportador de azeite da União Europeia e o 4º a nível mundial. O ritmo de crescimento das exportações (média anual de 11,2% para o período 2000/2011) tem superado o das importações (média anual de 7,4% para o período 2000/2011), no qual se destaca o crescimento acentuado das exportações de azeite de maior valor acrescentado, azeite virgem extra. Entre os mercados de destino das exportações nacionais, destaca-se o mercado brasileiro que absorve cerca de 49% do total das exportações nacionais de azeite, fazendo com que este produto seja igualmente o produto português mais exportado para aquele país, e Espanha com 21%. Em 2012 Portugal exportou 83 942 toneladas de azeite, mais 60% do que a média dos três anos anteriores. A mesma associação estima ainda as exportações irão continuar a aumentar à média de 30% ao ano (Figura 2).

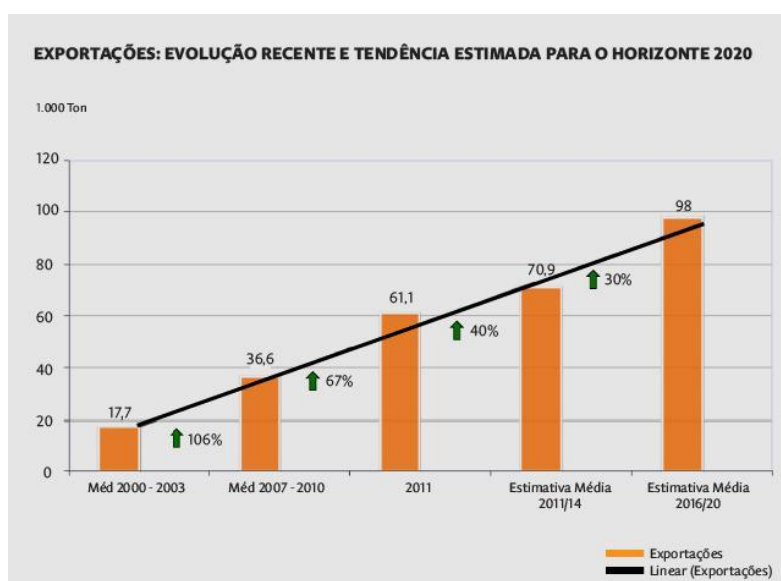


Figura 2 Evolução recente das exportações e tendência para o horizonte 2020 (Casa do Azeite, 2015)

Relativamente ao consumo, verifica-se nos últimos 15 anos, um crescimento médio, a nível mundial, da ordem dos 1,9%. Este aumento 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. De referir que o consumo de azeite na União Europeia representa cerca de 59% do consumo mundial, embora o consumo de azeite em países que tradicionalmente não eram consumidores, como os Estados Unidos da América, tenha sofrido um forte acréscimo nos últimos anos. De facto, neste país, o consumo quase duplicou em 15 anos, atingindo atualmente cerca de 294 000 toneladas anuais e colocando este país como o terceiro maior consumidor a nível mundial. Relativamente ao consumo de azeite em Portugal, verifica-se uma nítida recuperação comparativamente ao início da década de 90, em que o consumo *per capita* se situava em 3,3 Kg, atingindo atualmente um valor próximo dos 7,0 Kg *per capita*. Este aumento de consumo não será seguramente alheio à redescoberta do azeite como produto natural, saudável e com inúmeros benefícios para a saúde (Casa do Azeite, 2015). Apesar do consumo interno de azeite tem aumentado 3,3% ao ano entre 2000 e 2010, atingindo em 2010 o valor mais elevado dos últimos anos, Portugal ainda regista um baixo consumo *per capita* quando comparado com a Grécia onde, em 2009, cada habitante consumiu em média 20 kg de azeite, Espanha 12 kg e Itália 11 kg (GPP, 2013).

2.2 – PRINCIPAIS CULTIVARES DE AZEITONA NO ALENTEJO

A área de cultura da oliveira encontra-se distribuída por todas as regiões agrárias do continente, destacando-se o Alentejo e Trás-os-Montes como principais regiões produtoras: o Alentejo com 41,7% e Trás-os-Montes com 20,8%. Na região da Beira interior a área de olival tem uma ocupação de 17,9% e no Ribatejo de Oeste 11,3%. A vocação dominante do olival português é para a extração de azeite, com cerca de 96% do total da azeitona produzida destinada à obtenção deste produto e apenas cerca de 4% canalizada para a azeitona de mesa (MADRP-GPP, 2007, citado por Costa, 2012).

A produção de azeitona para azeite atingiu 415 mil toneladas na campanha de 2009-2010, o valor mais alto registado nas últimas épocas e 24% acima do registado na campanha anterior. Para este aumento contribuiu a entrada em plena produção dos olivais intensivos, principalmente no Alentejo (Costa, 2012).

As principais cultivares de azeitona existentes em Portugal são as seguintes: Galega ou Galega Vulgar, Carrasquenha, Redondil, Azeitoneira ou Azeiteira, Branquita ou Blanqueta, Conserva de Elvas, Negrinha, Madural, Cobrançosa, Verdeal Transmontana, Redondal, Galega grada de Serpa, Cordovil de Serpa, Verdeal Alentejana ou Verdeal de Serpa, Cordovil de Castelo Branco, Bical de Castelo Branco, Maçanilha Algarvia, Maçanilha, Carrasquenha de Almendralejo, Picual, Maçanilha ou Maçanilha Fina, Hojiblanca, Gordal e Arbequina (CONFAGRI, 2013).

As cultivares de azeitona com maior importância na região do Alentejo são a Redondil, Carrasquenha e Cordovil na zona norte e as Galega Vulgar, Cordovil de Serpa e Verdeal Alentejana a sul (CEPAAL, 2013). Nos novos olivais no Alentejo têm hoje também grande importância as cultivares Cobrançosa, originária de Tràs-os-Montes e Arbequina, vinda de Espanha (Costa, 2012).

A seguir são descritas algumas características das cultivares nacionais presentes no Alentejo; exclui-se, assim, a cultivar Arbequina uma vez que tem origem espanhola e não se inclui no tema deste trabalho.

2.2.1 – Cultivar Galega Vulgar

A cultivar Galega vulgar predomina em praticamente todas as regiões do país, com exceção de Tràs-os-Montes e Algarve. É apreciada pela sua tolerância à seca, mas é sensível ao frio, à salinidade e ao calcário. Tem entrada em produção precoce, produção elevada e a sua época de colheita é temporã. Os frutos, pequenos e elipsoidais, têm elevada resistência ao desprendimento, o que dificulta a colheita mecânica (Barranco *et al*, 1999; CEPAAL, 2013; Costa, 2012).

A cultivar Galega vulgar é utilizada principalmente para a extração de azeite, embora seja também apreciada como azeitona de mesa. O seu rendimento em azeite é baixo

(cerca de 15%) mas muito equilibrado na composição em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, o que o torna particularmente indicado na dieta alimentar. O teor relativamente baixo de compostos fenólicos é compensado pela presença de tocoferóis e pela particular composição em ácidos gordos, tornando-o bastante resistente à oxidação (COI, 2000; Costa, 2012; Mansinho *et al*, 2007).

O azeite extraído desta cultivar é suave, espesso, fundamentalmente “doce”, com verde folha de oliveira e notas de maçã ou amêndoa, dependendo do estado de maturação dos frutos; pode ser ligeiramente amargo e picante (CEPAAL, 2013; Gouveia, 2011).

2.2.2 – Cultivar Cobrançosa

A cultivar Cobrançosa possui um conteúdo médio em azeite. É apreciada pela sua tolerância ao frio e à clorose férrica mas é susceptível à seca e à salinidade. Tem produção elevada e constante. A época de maturação dos frutos é média e apresenta baixa resistência ao desprendimento, sendo a sua queda natural muito escassa, o que facilita a colheita mecanizada. O fruto possui um tamanho mediano, de forma elipsoidal com o diâmetro máximo na parte mediana (COI, 2000; Costa, 2012).

O azeite extraído desta cultivar é marcado por um frutado intenso e fresco a verde folha e relva acabada de cortar com notas a maçãs verdes. Sabor amargo e picante intenso. O seu aroma é limpo e complexo, sendo muito elaborado na boca e persistente (Gouveia, 2011; Veá, 2011)

2.2.3 – Cultivar Cordovil de Serpa

A cultivar Cordovil tem um bom rendimento em azeite. O fruto tem uma dimensão média, de forma obvoide ou elipsoidal; é medianamente resistente à mosca e mais susceptível à gafa e à tuberculose (Gama, 2002).

O azeite obtido desta cultivar é muito fino, com frutado intenso a verde folha, fresco, amargo e picante (Gouveia, 2011).

2.2.4 – Cultivar Verdeal Alentejana

A cultivar verdeal alentejana é uma cultivar de maturação serôdia, sendo a mais tardia que se conhece na região, atingindo o seu rendimento máximo em azeite com o fruto ainda verde. É bastante produtiva e regular, com bom rendimento em azeite e bastante resistente à gafa e à mosca (Gama, 2002).

O azeite oriundo desta cultivar possui um frutado intenso a verde folha, marcadamente amargo e picante (Gouveia, 2011).

2.2.5 – Cultivar Carrasquenha

A cultivar carrasquenha é pouco suscetível aos ataques da gafa e apresenta alguma resistência à mosca. O seu fruto tem um tamanho médio a grande e forma elipsoidal com o diâmetro máximo na parte mediana. Esta cultivar tem dupla aptidão uma vez que também pode ser utilizada para conserva em verde, tradicional ou industrial (Gama, 2002).

O azeite é complexo, marcado por verde folha, com notas de maçã, casca de banana verde e frutos secos (Gouveia, 2011).

2.2.6 – Cultivar Redondil

A cultivar redondil é muito produtiva e com um bom rendimento em azeite. O fruto tem um tamanho médio a grande e forma apical arredondada. É uma cultivar suscetível à mosca, à gafa e ao granizo. Possui dupla aptidão, uma vez que as azeitonas são muito utilizadas para conserva em verde, tanto caseira como industrial (Gama, 2002).

O azeite é complexo, marcado por verde folha, com notas de maçã, banana e frutos secos (Gouveia, 2011).

2.3 – A AZEITONA

2.3.1 – Composição

A oliveira, *Olea europaea* L. enquadra-se na família botânica das *Oleaceae*, com mais de 25 géneros. O género *Olea* é composto por mais de 30 espécies, entre as quais se encontra a *Olea europaea*, L. onde estão todas as oliveiras cultivadas (*Olea europaea* L., var. *europaea*) e também as oliveiras bravas ou zambujeiros (*Olea europaea* L., var. *sylvestris* Brot.) (Costa, 2012). A *Olea europaea*, L. é a única espécie da família *Oleaceae* com fruto comestível (Rapoport, 1998).

A oliveira floresce na Primavera e produz um fruto que se desenvolve e amadurece entre os meses de Outubro e Janeiro, dependendo da cultivar e região (Owen *et al*, 2000).

As características morfológicas e a composição química da azeitona dependem de diversos fatores como a cultivar, o estado de maturação, a época de colheita, a região, as características edafo-climáticas e o modo de produção (Costa, 2012).

Em termos botânicos, a azeitona é uma drupa de forma oval mais ou menos alongada ou arredondada, de acordo com a cultivar (Curci, 2001).

O peso do fruto é variadíssimo, oscilando entre 1,5 e 12 g (Gouveia, 1996), embora nas cultivares para obtenção de azeite os valores se situem, geralmente, entre 1,5 e 5g (Ruiz, 1991). Quando está completamente desenvolvido, o mesocarpo representa 70% a 90%, o caroço 9% a 27% e a semente 2% a 3% do peso total do fruto (Hermoso *et al*, 1999; Monteiro, 1999).

De acordo com Curci (2001), os principais constituintes da azeitona são a água (50% a 60%) e o azeite (18% a 25%). Seguem em importância quantitativa os hidratos de carbono (19% a 20%), a fibra (5% a 6%), a proteína (1% a 3%) e as cinzas (1,5%).

As proteínas são constituídas por todos os aminoácidos conhecidos, avultando a arginina que representa 25% do total, seguida da leucina e valina e dos ácidos aspártico e glutâmico. Na cinza predomina o potássio, ao qual se seguem, com menor importância, o fósforo, o cálcio, o magnésio e o sódio. Os ácidos orgânicos (cítrico,

málico e oxálico) podem representar 0,5% a 1,0% da polpa e são responsáveis por um pH entre 4,1 e 5,5. Os principais açúcares são a glicose, a frutose, o manitol, a sacarose e também, com menor importância, a xilose e a ramnose (Gouveia, 1995).

A azeitona é conhecida por conter altas concentrações de compostos fenólicos (1% a 3% da polpa) que exibem propriedades biológicas importantes incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, cardio-protetora, hipoglicêmica e anticancerígena (Cardoso *et al*, 2011; Estie *et al*, 1998). Estes compostos contribuem ainda para as características sensoriais dos azeites virgens, sendo responsáveis pelo característico amargor, pungência e adstringência (Ouni *et al*, 2011).

Os compostos fenólicos da azeitona variam entre 1% e 3% do peso da polpa fresca, sendo o conteúdo altamente dependente da cultivar e do estado de maturação do fruto (Zoidou *et al*, 2009). As principais classes de compostos fenólicos presentes no fruto são ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides e secoiridoides. O (3,4-dihidróxifenil)etanol (3,4-DHPEA) e o (p-hidróxifenil)etanol (p-HPEA) são os álcoois fenólicos mais abundantes. Os flavonoides incluem glucósidos flavonólicos como a luteolina-7-glucósido e rutina, assim como antocianinas, cianidina e glucósidos de delphinidina. Enquanto os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos e flavonoides ocorrem em muitos frutos e vegetais, os secoiridoides estão presentes exclusivamente em plantas pertencentes à família das *Oleaceae*. Os compostos fenólicos classificados como secoiridoides caracterizam-se pela presença de ácido elenólico ou derivados deste ácido na sua estrutura molecular. Ácidos fenólicos com uma estrutura química básica de C6-C1 (ácidos benzoicos) e C6-C3 (ácido cinâmico) também se encontram nas azeitonas (Servilli *et al*, 2002, Allalout *et al*, 2009).

A azeitona é particularmente rica em secoiridoides como a oleuropeína, dimetiloleuropeína e o ligstroside e nos seus derivados hidrolíticos como as agliconas da oleuropeína, o ácido eleanólico, o hidroxitirosol e o tirosol. Contém ainda quantidades apreciáveis de glucósidos do flavonoide, como a rutina e a luteolina e alguns derivados de ácidos hidrocinâmicos, com predominância do verbascosídeo (Cardoso *et al*, 2011)

O principal composto fenólico é a oleuropeína, presente na azeitona à razão de 20 a 1000 mg/Kg de extrato seco. É um glucósido do ácido elenólico, esterificado pelo hidroxitirosol (Gouveia, 1995). Possui propriedades antioxidantes aprisionando os radicais livres e contribui para a prevenção da aterosclerose inibindo a oxidação das LDL e aprisionando diversas espécies que reagem com o oxigénio na parede vascular. Adicionalmente, a oleuropeína exibe atividade antimicrobiana, anticancerígena e protetora contra a osteoporose. Recentemente verificou-se que faz baixar os níveis de colesterol total e dos triacilgliceróis, podendo ser futuramente aplicada no tratamento das doenças coronárias (Zoidou *et al*, 2009).

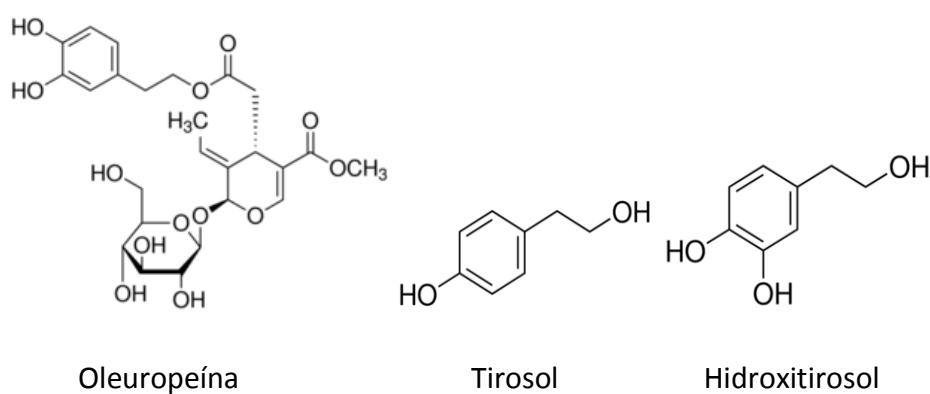


Figura 3 Principais compostos fenólicos presentes na azeitona (adaptado de Bullota *et al*, 2014)

2.3.2 – Maturação

A azeitona é uma drupa inicialmente de cor verde. Durante o processo de amadurecimento vai escurecendo tornando-se primeiro roxa e depois negra. À medida que a maturação progride, a atividade fotossintética diminui e as clorofilas decompõem-se acompanhando a transformação dos cloroplastos em cromoplastos. No final do processo de maturação, a cor é devida à formação de antocianinas (Baccouri *et al*, 2008).

A maturação é uma combinação de mudanças fisiológicas e bioquímicas influenciadas por diversas condições ambientais e culturais, geneticamente controladas, sendo um dos fatores mais importantes associados com a avaliação da qualidade da azeitona. No decurso do amadurecimento, a atividade fotossintética diminui e aumenta a quantidade de azeite. A data da colheita dos frutos pode ter um efeito significativo na qualidade do azeite, uma vez que está fortemente dependente das condições

fisiológicas do fruto. De facto, existem numerosas cultivares de azeitona com características físicas e bioquímicas específicas que dão origem a azeitonas e azeites com composições típicas (Conde *et al*, 2008; Dagdelen *et al*, 2012).

A maturação da azeitona ocorre durante um período de vários meses. A acumulação de azeite começa cerca de 40 a 50 dias após a floração e continua, rapidamente, até ao amadurecimento do fruto; depois abranda mas não pára. Durante o processo de maturação dão-se várias alterações no fruto, tanto físicas como químicas. Estas alterações variam de acordo com a cultivar, clima e condições de crescimento da azeitona: o perfil dos ácidos gordos modifica-se, o teor de polifenóis diminui, o perfil de polifenóis altera-se e o teor de clorofila reduz-se (Ayton, 2012; Beltrán *et al*, 2005; Matos *et al*, 2006). As alterações nestes componentes são comercialmente relevantes uma vez que têm um efeito significativo na estabilidade e nas características sensoriais dos azeites extraídos (Ayton, 2012). Assim, para além da qualidade do azeite estar fortemente relacionada com as condições fisiológicas dos frutos que lhe dão origem, o grau de maturação pode afetar direta ou indiretamente a qualidade do azeite extraído (Mendoza *et al*, 2013).

2.3.2.1 – Crescimento da azeitona

O período de crescimento, desenvolvimento e amadurecimento da azeitona é prolongado, variando com a cultivar, práticas culturais, nível de colheita das árvores, condições climáticas, entre outros (Mailer *et al*, 2005). No entanto e, de acordo com Hermoso *et al* (1998), o período de maturação da azeitona pode estabelecer-se em 200 dias como valor médio.

Como na maioria das drupas, o crescimento da azeitona segue uma curva dupla sigmoidal com uma etapa de latência inicial e outra final. Durante a primeira fase, de crescimento rápido, termina a divisão celular da maior parte dos tecidos do fruto, sendo o endocarpo o principal tecido em desenvolvimento, chegando a ocupar 80% do volume do fruto. Na fase II, de crescimento lento, o endocarpo endurece progressivamente e, tanto o embrião como o caroço, alcançam o seu tamanho final. A fase III, de crescimento rápido devido ao aumento do tamanho das células da polpa,

determina o tamanho real do fruto. Nesta fase inicia-se a biossíntese do azeite e a sua acumulação (Hermoso *et al*, 1998).

No início do Outono a cor verde intensa transforma-se em verde claro, depois em verde amarelado. Continuando, começam a aparecer manchas violáceas, principalmente no ápice, que se estendem e acabam por ocupar todo o epicarpo, penetrando finalmente até ao caroço. Entretanto o epicarpo também mudou de cor, desde o violáceo até ao violeta escuro, cobrindo-se de uma camada esbranquiçada de pruína. As cores finais, tanto na polpa como na pele do fruto, adquirem as tonalidades características de cada cultivar. Na maioria das cultivares estas últimas transformações não acontecem em todos os frutos ao mesmo tempo, alcançando-se a maturação de uma forma escalonada (Mailer, 2005).

2.3.2.2 – Biossíntese dos ácidos gordos e triacilgliceróis

A biossíntese dos ácidos gordos efetua-se nos plastídios das células através de uma sequência de processos bioquímicos. Em primeiro lugar forma-se a cadeia gorda saturada, processo responsável pela síntese dos ácidos gordos saturados até ao palmítico que, na essência, consiste na condensação sucessiva de unidades de acetato. Esta cadeia vai sendo aumentada e dessaturada dando origem a toda a gama de ácidos gordos saturados e insaturados necessários ao funcionamento dos seres vivos. A matéria prima para a formação dos ácidos gordos, o acetil-co A, assim como os cofatores necessários, obtêm-se no metabolismo dos açúcares, existindo uma correlação negativa entre o conteúdo em lípidos da polpa e o conteúdo em açúcares redutores da mesma ao longo do desenvolvimento e maturação da azeitona (Conde *et al*, 2008; Hermoso *et al*, 1998).

Estas reações são reguladas por uma série de enzimas, especialmente pela acetil CoA transferase que determina, em grande parte, a taxa de biossíntese dos ácidos gordos. O alongamento dos ácidos gordos evolui através de uma cadeia de reações catalizadas por um complexo de várias enzimas individuais, coletivamente denominadas de ácidos gordos sintetase. Os produtos formados por este sistema enzimático são essencialmente ácidos gordos saturados com cadeias de 8 a 18 átomos de carbono. A

especificidade do substrato e a actividade relativa destas enzimas determinam o padrão de produtos sintetizados predominando, no mesocarpo das células, o oleato e, em menor quantidade, o palmitato. Estes produtos são re-esterificados e exportados para o citosol, sendo utilizados no retículo endoplasmático pelas aciltransferases para a formação e armazenamento de triacilgliceróis de reserva. A síntese dos triacilgliceróis e dos ácidos gordos formados nos plastídios ocorrem através de uma série de reações enzimáticas sendo as aciltransferases envolvidas no processo responsáveis pela composição em ácidos gordos dos resultantes triacilgliceróis (Conde *et al*, 2008)

Os mesmos autores concluem que a qualidade do azeite sintetizado depende, entre outros factores, da composição dos triacilgliceróis sendo esta composição influenciada pela actividade das enzimas envolvidas na biossíntese e armazenamento dos triacilgliceróis durante a maturação da azeitona. Este controlo é exercido ao nível da síntese dos ácidos gordos nos plastídios, nas subsequentes reações de modificação destes ácidos gordos e ao nível das aciltransferases durante a acumulação de lípidos nas células.

A biossíntese dos lípidos da azeitona dá-se em três fases:

Numa primeira fase, a biossíntese é lenta, produzindo-se essencialmente o crescimento do fruto sem depósito apreciável de matéria gorda. De seguida há uma fase de biossíntese acelerada durante a qual as azeitonas acumulam lípidos abundantes. O peso médio, o conteúdo em água e lípidos nos frutos completamente maduros acabam por estacionar. Os triacilgliceróis constituem então cerca de 97% do peso dos lípidos totais, sendo a principal forma de armazenamento e integração dos ácidos gordos durante a maturação. A terceira fase é uma fase estacionária, sendo a biossíntese dos lípidos lenta ou nula. No final desta fase existe uma leve diminuição do nível de lípidos, especialmente dos triacilgliceróis, nos frutos sobremaduros (Salah *et al*, 1984).

Durante o período de biossíntese dos lípidos, as disponibilidades hídricas do fruto determinam o seu tamanho e acumulação de azeite. Assim, a falta de água pode

originar frutos pequenos, com pouca polpa e afetar o rendimento total em azeite (Hermoso *et al*, 1998).

2.3.2.3 – Alterações nos principais componentes do azeite na azeitona

Durante o período de maturação das azeitonas desenvolvem-se vários processos metabólicos com subseqüentes variações no perfil de alguns compostos. Estas alterações refletem-se na qualidade, nas características sensoriais, na estabilidade oxidativa e no valor nutricional dos azeites extraídos (Allalout *et al*, 2009; Baccouri *et al*, 2007; Hermoso *et al*, 1998; Mendoza *et al*, 2013).

A evolução da composição em ácidos gordos não tem total concordância entre autores. Enquanto Cinquanta *et al* (2001) referem um aumento no conteúdo em ácido oleico e uma diminuição no ácido palmítico, Hermoso *et al* (1998) indica um aumento na percentagem de ácido linoleico, uma diminuição na proporção de ácido palmítico e a constância da percentagem de ácido oleico com a conseqüente diminuição da relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados. Já Salah *et al* (1984) referem um aumento progressivo da percentagem de ácido oleico desde a maturação ótima, uma diminuição clara do ácido palmítico, uma diminuição leve do ácido linoleico e uma constância do conteúdo em ácido palmitoleico e esteárico. Baccouri *et al* (2008) observaram uma ligeira diminuição do conteúdo em ácido palmítico, uma descida gradual da percentagem de ácido oleico e um aumento do ácido linoleico. O autor refere uma diminuição na relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados durante a maturação, explicada pela atividade da enzima oleato desaturase que transforma o ácido oleico em linoleico.

De acordo com Matteucci *et al* (2011) esta discordância na evolução dos ácidos gordos poderá estar relacionada com diferenças na tolerância ao frio entre génotipos. Em um ensaio realizado pelos autores verificou-se existir uma relação direta entre a expressão das enzimas ácidos gordos dessaturases (AGD) e a dessaturação dos lípidos nos génotipos sensíveis às baixas temperaturas.e a relação inversa nos génotipos resistentes ao frio.

Sabe-se que as membranas celulares são o principal local onde ocorrem danos induzidos pelo frio e que a aclimatização às baixas temperaturas inclui a activação de mecanismos que protegem a fluidez das membranas, assegurando a optimização da actividade enzimática associada. Assim, a capacidade para ajustar a fluidez lipídica das membranas modificando o nível de ácidos gordos insaturados em resposta às baixas temperaturas e também em resposta a outros factores de stress abióticos ou bióticos é da responsabilidade da regulação da actividade das ácidos gordos dessaturases (AGD). Os resultados deste estudo mostraram que as células do mesocarpo são sensíveis ao frio em todos os génotipos, antes das primeiras gotículas de azeite se formarem no fruto. A sensibilidade ao frio decresce durante a fase de produção do azeite, aparecendo as diferenças relacionadas com o génotipo no final da biogénese lipídica, devido a diferenças na transcrição das enzimas AGD. Conclui-se que o teor de ácidos gordos insaturados modifica-se de acordo com o génotipo em frutos expostos ao frio durante o período de maior transcrição das enzimas AGD (Matteucci *et al*, 2011).

Os triacilgliceróis constituem a maior parte dos lípidos totais do fruto e a evolução do seu conteúdo é muito semelhante à dos ácidos gordos totais. Existe uma diminuição razoável desde a altura da colheita ótima até à sobrematuração. Inicialmente, a acompanhar a diminuição dos triacilgliceróis, observa-se uma fase de aumento dos diacilgliceróis e ácidos gordos livres, devido a uma certa actividade lipásica na polpa; depois, os diacilgliceróis mantêm-se estáveis e os ácidos gordos livres diminuem. A leve regressão dos ácidos gordos livres, mantendo-se estáveis os diacilgliceróis pode explicar-se pela ação de enzimas de beta oxigenação que os degradam dando origem a moléculas de acetato. Estas moléculas, por sua vez, são degradadas completamente pelo ciclo glicólítico. O aumento da percentagem de ácido palmítico nos ácidos gordos livres, simultaneamente com a sua diminuição nos triacilgliceróis, pode explicar-se por uma certa especificidade da lipase que atua preferencialmente nos ácidos gordos saturados que ocupam posições periféricas na molécula do triacilglicerol (Salah *et al*, 1984).

Os compostos fenólicos são um grupo importante de compostos, produzidos no metabolismo secundário de numerosas plantas, na natureza (Bakhouche *et al*, 2013).

O conteúdo em compostos fenólicos, cuja influência na qualidade do azeite é manifesta, alcança um máximo quando a maioria dos frutos perde a cor verde e diminui com o avanço da maturação (Conde *et al*, 2008; Hermoso *et al*, 1998; Rotondi *et al*, 2004). O rápido declínio do conteúdo em compostos fenólicos que ocorre durante a última fase da maturação está provavelmente relacionado com o aumento da actividade das enzimas hidrolíticas durante esta fase (Conde *et al*, 2008).

A oleuropeína, o maior secoiridoide da azeitona é responsável pelo atributo amargo dos frutos e decresce durante a maturação (Yorulmaz, 2013). Quando os frutos têm cerca de 6 meses, os principais componentes fenólicos são glucósidos secoiridoide, denominados ligstrosido e glucósido da oleuropeína que não são detetados no respetivo azeite virgem. Os precursores dos glucósidos encontram-se no pericarpo da azeitona mas, à medida que a maturação avança, estes compostos são deglucosilados pelas glucosidases (enzimas glucosídicas), libertando secoiridoide. Estes, juntamente com vários outros produtos de transformação, conseguem atravessar a barreira água/azeite e tornar-se importantes antioxidantes no azeite extraído (Owen *et al*, 2000).

De facto, também Cinquanta *et al* (2001) afirmam que, apesar da oleuropeína, um ester glucosídico do ácido elenólico e o 3,4-DHPEA, serem os principais compostos fenólicos nas azeitonas, a sua concentração decresce, notavelmente, no decurso da maturação, enquanto o conteúdo nos seus derivados, hidroxitirosol, ácido elenólico e dimetiloleuropeína aumenta (Yorulmaz *et al*, 2013).

Existem diferenças significativas na evolução da composição fenólica das várias cultivares de azeitona durante a maturação, o que indica que o metabolismo dos compostos fenólicos difere com a cultivar e/ou origem geográfica dos frutos (Yorulmaz *et al*, 2013). Conde *et al* (2008) referem que o conteúdo em compostos fenólicos, tanto quantitativamente como qualitativamente, tem uma importante base genética e pode ser fortemente afectado por condições pedo-climáticas, técnicas agronómicas e maturação dos frutos.

Curiosamente, Oueslati *et al* (2009) referem não ter encontrado uma relação clara entre o conteúdo em compostos fenólicos totais e o índice de maturação das

azeitonas. Este resultado pode estar relacionado com o facto de azeitonas de dois estados de maturação terem sido colhidas no mesmo dia. Os autores concluem que, provavelmente, a redução no conteúdo em compostos fenólicos totais observado em outros estudos deverá ser atribuída ao período de colheita e não à cor da pele dos frutos. A degradação enzimática e oxidativa dos compostos fenólicos na azeitona aumenta com o avanço do período de colheita como consequência provável da senescência dos tecidos.

Os tocoferóis são designados por “vitamina E” e possuem atividade anti-oxidante, inibindo efectivamente a oxidação lipídica dos alimentos e sistemas biológicos (Psomiadou *et al*, 2000; Beltrán *et al*, 2005).

O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, designados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (Chu *et al*, 2006). Tanto os tocoferóis como os tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isómeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos metílicos substituintes no anel cromanol. A molécula tocol exhibe isomerismo óptico atribuído aos três átomos de carbono assimétricos nas posições 2, 4' e 8', totalizando oito formas estereoisoméricas possíveis. Os tocoferóis e tocotrienóis encontram-se em proporções variáveis nas plantas, sendo as fontes principais os óleos vegetais, especialmente o azeite virgem e o isómero mais abundante o α - tocoferol (Dagdalen *et al*, 2012; Psomiadou *et al*, 2000).

Durante a maturação, a generalidade dos autores refere um decréscimo do conteúdo em tocoferóis, especialmente em α -tocoferol (Beltran *et al*, 2005; Hermoso *et al*, 1998; Yorulmaz *et al*, 2013); existem, no entanto, outros que afirmam ser a variação do conteúdo em α -tocoferol, dependente da cultivar (Dagdalen *et al*, 2012)

Como consequência da evolução dos parâmetros anteriores: relação entre ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados e o conteúdo em compostos fenólicos e tocoferóis, a estabilidade dos azeites extraídos tende a diminuir com o avanço da maturação dos frutos (Hermoso *et al*, 1998).

A presença de pigmentos não só determina a cor do produto, mas também influencia sua atividade oxidativa, devido ao seu papel como antioxidantes na ausência de luz e pro-oxidantes na presença de luz (Oueslati *et al*, 2009)

O conteúdo em clorofilas e derivados depende do estado de maturação das azeitonas e decresce continuamente desde o início até ao final do período (Baccouri *et al*, 2007; Baccouri *et al*, 2008; Gandul-Rojas e Mosquera, 1999).

A quantidade de carotenoides diminui ao longo do processo de maturação dos frutos (Baccouri *et al*, 2008), mas a relação carotenos/clorofilas tende a aumentar de forma considerável. Sendo estes pigmentos responsáveis pela cor do azeite, esta varia dos tons verdes aos amarelos, diminuindo também a sua intensidade (Hermoso *et al*, 1998). A variação da cor do azeite depende não só do decréscimo dos teores de clorofilas e carotenóides, mas também da formação de outros compostos como as antocianinas (Baccouri *et al*, 2007; Baccouri *et al*, 2008).

A qualidade do azeite virgem depende de vários fatores relacionados com a cultura da oliveira e com a colheita, armazenamento e extração dos frutos. De particular importância para a qualidade do azeite são a cultivar, as condições pedoclimáticas, assim como a fertilização e irrigação das árvores. Na realidade, a boa qualidade das azeitonas no momento da colheita é um fator decisivo, mas não o único, a assegurar a boa qualidade do azeite (Giovacchino *et al*, 2002).

A qualidade do azeite, no que se refere aos índices físico-químicos que se determinam, pode considerar-se que se mantém constante por um certo período de tempo após a maturação ótima, se os frutos permanecerem na árvore. No entanto, as características organolépticas do fruto modificam-se à medida que se atrasa a colheita, obtendo-se geralmente os azeites mais aromáticos e frutados no início da maturação, ainda com uma percentagem apreciável de frutos verdes (Kalua *et al*, 2007).

Nas azeitonas colhidas tardiamente, pode produzir-se uma certa degradação do azeite que altera a sua qualidade. Se a colheita se realiza no período ótimo de maturação, pode garantir-se tanto o rendimento máximo em azeite como a sua boa qualidade organoléptica (Salah *et al*, 1984).

2.4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

O azeite forma-se principalmente nas células da polpa da azeitona, em pequenas gotículas rodeadas por uma biomembrana protetora, durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto. O azeite, assim formado pela natureza, constitui uma reserva energética para a azeitona fazer face a períodos de crise, quando se liberta da planta mãe, para germinar e dar origem a uma nova planta (Ribeiro, 2005).

A composição química do azeite virgem divide-se em duas frações: a fração saponificável e a fração insaponificável. A fração saponificável (componentes maiores) inclui os gliceróis, triacilgliceróis e ácidos gordos livres, e representa mais de 98% do peso total do azeite. Esta fração caracteriza-se por um equilíbrio particular na composição em ácidos gordos, o que o identifica como gordura fundamental numa dieta lipídica equilibrada (Servilli *et al*, 2002) e influencia as características químicas, físicas e metabólicas do azeite (Ribeiro, 2005). A fração insaponificável (componentes menores), que atinge cerca de 2% do peso do azeite, inclui algumas centenas de compostos, como por ex^o, álcoois alifáticos e triterpénicos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis, pigmentos, polifenóis e tocoferóis (Servilli *et al*, 2002). Esta fração do azeite é a principal responsável pelo valor biológico e nutricional do azeite virgem, pelas características organoléticas e ainda pela sua resistência à oxidação (Gouveia, 1995).

2.4.1 – Fração saponificável

Segundo Curci (2001), os ácidos gordos livres que constituem os triacilgliceróis do azeite apresentam uma certa variabilidade, de acordo com a região de proveniência, havendo, no entanto, uma clara prevalência do ácido oleico. Ghanbari *et al* (2012) refere que a composição qualitativa em ácidos gordos é constante nos diferentes azeites virgens, variando quantitativamente a percentagem entre eles devido a diversos fatores como a cultivar, região, condições climáticas, quantidade de água disponível durante o crescimento da azeitona, altitude, estado de maturação dos frutos e processo tecnológico/condições de extração do azeite (Aguilera *et al*, 2005; Aparicio *et al*, 2002; Gouveia, 1995). Todas as cultivares contêm, em maior

percentagem, ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) Seguem-se os ácidos palmitoleico (C16:1), linolénico (C18:3) e araquídico (C20:0) e, finalmente, com uma percentagem geralmente inferior a 0,2%, os ácidos beénico (C22:0), eicosenóico (C20:1) e lignocérico (C24:0). O ácido oleico predomina sempre com uma percentagem que varia entre os 55% e os 83% do total de ácidos gordos (Ghanbari *et al*, 2012). Os ácidos gordos polinsaturados com uma cadeia de 18 átomos de carbono (C18) como o ácido linoleico (C18:2 ω -6) e o α -linolénico (C18:3 ω -3) não são sintetizados pelo corpo humano, sendo essencial o seu fornecimento através da dieta uma vez que são componentes indispensáveis na estrutura e funções celulares. As duas séries, ω -6 e ω -3, estão em contraste em numerosos aspectos. Assim, é importante que estejam presentes na dieta numa correcta relação, uma vez que o excesso de ácido linoleico pode prevenir a síntese endógena da longa cadeia do ácido α -linolénico, fundamental no desenvolvimento do cérebro e da retina (Viola *et al*, 2009). De acordo com o mesmo autor, a Organização Mundial de Saúde recomenda que a razão entre os ácidos linoleico e linolénico esteja compreendida entre 5:1 e 10:1, o que se encontra no azeite virgem e não na maioria dos outros óleos vegetais.

Os triacilgliceróis apresentam várias insaturações nas cadeias dos ácidos gordos. Essas insaturações tornam as estruturas hidrocarbonadas mais suscetíveis à oxidação pelo oxigénio e favorecem a produção de compostos voláteis secundários, de aroma e sabor desagradáveis. A produção de ácido oleico, que é especialmente propício à reação de oxidação, tende a ser superior em azeites provenientes das regiões mais quentes do sul da região mediterrânica, em relação a azeites de outras zonas (Owen *et al*, 2000).

A maior parte dos ácidos gordos do azeite estão presentes na estrutura dos triacilgliceróis, sendo os três principais triacilgliceróis os OOO (43,5%), POO (18,4%) e OOL (6,8%) onde O representa o ácido oleico, P o ácido palmítico e L o ácido linoleico (Kiritsakis *et al*, 2000). Gouveia (1996) refere que, devido ao facto do ácido oleico ser o ácido gordo de maior relevo, existe uma grande predominância do triacilglicerol trioleína (OOO) sobre os demais triacilgliceróis existentes.

De acordo com o mesmo autor, os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados situam-se, predominantemente, na posição β dos glicéridos e os restantes distribuem-se nas posições α e α' .

Os limites estabelecidos pelo Regulamento (EU) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro, para os ácidos gordos existentes no azeite são os seguintes:

Tabela 3 Nome, fórmula química e limites dos ácidos gordos existentes no azeite

NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	FÓRMULA	PERCENTAGEM
Mirístico	tetradecanoico	$C_{13}H_{27}COOH$ C14:0	≤ 0,05
Palmítico	hexadecanoico	$C_{15}H_{31}COOH$ C16:0	7,5 – 20,0
Palmitoleico	9-cis- hexadecenoico	$C_{15}H_{29}COOH$ C16:1	0,3 – 3,5
Margárico	heptadecanóico	$C_{16}H_{33}COOH$ C17:0	≤ 0,3
Margaroleico	heptadecenóico	$C_{16}H_{29}COOH$ C17:1	≤ 0,3
Estearíco	octadecanóico	$C_{17}H_{35}COOH$ C18:0	0,5 – 5,0
Oleico	9-cis- octadecenóico	$C_{17}H_{33}COOH$ C18:1	55,0 – 83,0
Linoleico	9,12-cis- octadecadienóico	$C_{17}H_{31}COOH$ C18:2	3,5 – 21,0
Linolénico	9,12,15-cis- octadecatrienóico	$C_{17}H_{29}COOH$ C18:3	≤ 1,0
Araquídico	eicosanóico	$C_{19}H_{38}COOH$ C20:0	≤ 0,6
Eicosenóico	eicosenóico	$C_{19}H_{36}COOH$ C20:1	≤ 0,4
Beénico	docosanóico	$C_{21}H_{43}COOH$ C22:0	≤ 0,2
Lignocérico	tetracosanóico	$C_{23}H_{47}COOH$ C24:0	≤ 0,2

De acordo com o Regulamento (EU) nº61/ 2011, para os azeites virgens, o valor da soma dos isómeros transoleicos é ≤ 0,05 e a soma dos isómeros translinoleicos e dos isómeros translinolénicos é ≤ 0,05.

A relação entre ácidos gordos monoinsaturados, normalmente designados por AGMI ou MUFA, e polinsaturados, designados por AGPI ou PUFA, é um parâmetro importante, sendo a razão ácido oleico/ ácido linoleico útil para caracterizar cultivares;

com uma relação bem definida com a estabilidade, um azeite será tanto mais resistente à oxidação quanto maior fôr esta razão (Aguilera *et al*, 2005; Ribeiro, 2005).

No azeite, os ácidos gordos livres resultam da hidrólise dos triacilgliceróis, em maior extensão, mas também dos diacilgliceróis e dos monoacilgliceróis, quer por ação microbiana, quer por ação enzimática (lipases), acelerada pela temperatura e catalisada principalmente pela luz, por outras radiações e por vestígios de metais como o ferro, o cobre e o níquel. Os ácidos gordos livres são responsáveis pela percentagem de acidez do azeite. Mães condições de armazenamento da azeitona, por exemplo, podem resultar num aumento considerável da acidez livre do azeite, com considerável prejuízo da sua qualidade (Costa, 2012).

O azeite virgem tem características nutricionais muito apreciadas devido à sua composição em ácidos gordos. Uma dieta saudável deve conter uma quantidade limitada de ácidos gordos saturados para diminuir o nível de colesterol total e um elevado conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados para prevenir o risco de doenças cardiovasculares, reduzir a necessidade de insulina pelo organismo e baixar a concentração de glucose no plasma (Zarrouk *et al*, 2009).

A descrição de uma cultivar específica com base no seu perfil em ácidos gordos é importante, uma vez que este parâmetro é um dos parâmetros de qualidade de um azeite virgem e tem um poder discriminante positivo permitindo distinguir azeites virgens elementares, mesmo quando originários de áreas geográficas muito próximas (Gurdeniz *et al*, 2008).

De acordo com Rondanini *et al* (2011), existe uma relação negativa entre o conteúdo em ácido oleico e a temperatura média ambiente durante a acumulação de azeite no fruto, sugerindo haver diferenças no controlo metabólico da síntese de azeite para as cultivares. Também Matteucci *et al* (2011) sugerem haver uma influência da temperatura na biossíntese dos ácidos gordos que se traduz no aumento no teor de ácido linoleico e na diminuição do ácido linolénico associados com a aclimação das cultivares às baixas temperaturas. Uma vez que a actividade da galactolipase é aumentada em variadas situações de stress, haverá um aumento da produção de ácido linoleico livre nos cloroplastos devido ao aumento da actividade da galactolipase

quando a temperatura desce. Em um ensaio realizado pelo autor é referida a caracterização recente de duas lipoxigenases nas azeitonas das cultivares Arbequina e Picual. Após um aumento do nível de transcrição das duas enzimas nas duas cultivares, houve uma descida acentuada na cultivar Picual, resistente ao frio, o que prova a existência de diferenças entre genótipos relacionadas com a temperatura. Assim Matteucci *et al* (2011) concluem que o frio (temperatura de 10°C durante 14 dias correspondentes à fase mais activa de produção de azeite nas células) induz alterações na transcrição destas enzimas durante a biogénese do azeite. Para os genótipos sensíveis à temperatura, o teor de ácidos gordos polinsaturados linoleico e linolénico aumentou nas drupas expostas às baixas temperaturas durante a fase mais intensa da transcrição enzimática. Nos genótipos resistentes às baixas temperaturas não se encontraram diferenças significativas nos teores de ácido linoleico e linolénico quando comparados com as amostras controlo (a 30°C). Não houve alterações no conteúdo em ácido oleico com a variação da temperatura em ambas as cultivares.

Apresenta-se, de seguida, a tabela 4 onde se pretende mostrar, com base na bibliografia consultada, as diferenças no perfil dos ácidos gordos de acordo com a cultivar e com a região de origem do azeite.

Tabela 4 Perfil ácido de azeites virgens provenientes de diferentes cultivares e origens geográficas

Cultivar	Região	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	O/ L	Referência
Arbequina	Espanha	13,3	----	----	70,5	11,7	----	6,02	Allalout <i>et al</i> (2009)
Arbequina	Marrocos	17,7	1,9	1,9	69,1	8,13	0,5	8,49	Farid <i>et al</i> (2013)
Arbequina	Marrocos	14,3	----	2,0	67,1	13,2	0,8	5,08	Gharby <i>et al</i> (2013)
Arbequina	Portugal	17,1	2,3	1,7	62,9	13,8	0,6	4,56	Baer (2013)*
Arbequina	Tunisia	17,4	2,9	1,7	60,1	16,2	0,7	3,70	Zarrouk <i>et al</i> (2009)
Arbequina	Tunisia	17,6	2,4	1,9	58,8	12,9	0,6	4,63	Allalout <i>et al</i> (2009)
Arbequina	Argentina	19,2	3,3	1,6	51,8	21,9	1,0	2,36	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Arbosana	Marrocos	13,7	1,3	1,9	75,7	5,7	0,6	13,37	Farid <i>et al</i> (2013)
Arbosana	Espanha	13,4	----	----	74,3	7,6	----	9,78	Allalout <i>et al</i> (2009)
Arbosana	Tunisia	17,8	2,1	2,1	64,8	12,1	0,5	5,36	Allalout <i>et al</i> (2009)
Arbosana	Argentina	16,5	2,8	2,0	61,0	15,6	0,9	3,91	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Ayalik	Turquia	15,4	1,8	2,4	67,3	12,0	0,5	5,63	Gurdeniz <i>et al</i> (2008)
Chemlali	Tunisia	19,7	2,2	2,8	54,9	18,1	0,9	2,99	Zarrouk <i>et al</i> (2009)
Chetoui	Tunisia	15,1	0,4	2,7	66,7	13,9	0,7	4,81	Haddada <i>et al</i> (2008)
Cobrançosa	Portugal	9,93	0,3	4,1	78,0	6,1	0,6	11,1	Matos <i>et al</i> (2007)
Coratina	Itália	9,7	----	2,1	79,5	5,8	0,5	13,82	Aparicio <i>et al</i> (2002)
Coratina	Tunisia	13,5	1,1	2,7	70,9	9,8	1,0	7,26	Zarrouk <i>et al</i> (2009)
Coratina	Argentina	12,9	0,7	2,1	68,9	12,9	0,9	5,34	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Frantoio	Itália	12,9	1,1	2,1	75,3	7,3	0,6	10,30	Marini <i>et al</i> (2004)
Frantoio	Espanha	12,7	1,0	1,6	74,6	8,6	0,5	8,67	Aguilera <i>et al</i> (2005)
Frantoio	Argentina	15,4	1,6	2,3	63,1	15,3	1,0	4,12	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Hojiblanca	Espanha	12,0	0,7	2,0	75,0	7,6	0,9	9,87	Beltrán <i>et al</i> (2005)
Hojiblanca	Argentina	15,8	1,4	2,2	69,8	8,0	1,3	8,72	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Koroneiki	Creta	15,0	----	2,4	77,1	4,7	0,4	16,40	Aparicio <i>et al</i> (2002)
Koroneiki	Grécia	10,4	----	----	76,2	8,3	----	9,14	Allalout <i>et al</i> (2009)
Koroneiki	Marrocos	15,7	1,2	0,5	76,2	5,3	0,6	14,50	Farid <i>et al</i> (2013)
Koroneiki	Tunisia	11,7	1,1	2,2	75,5	8,6	0,3	8,85	Allalout <i>et al</i> (2009)
Koroneiki	Tunisia	12,9	1,2	2,5	74,4	7,1	0,9	10,48	Zarrouk <i>et al</i> (2009)
Leccino	Espanha	13,8	1,2	1,7	76,0	6,0	0,5	12,7	Aguilera <i>et al</i> (2005)
Leccino	Itália	13,4	1,2	1,8	75,1	6,3	0,7	11,92	Marini <i>et al</i> (2004)
Madural	Portugal	10,2	0,3	2,2	71,8	12,3	0,9	5,6	Matos <i>et al</i> (2007)
Picholine	Marrocos	9,2	----	2,9	74,6	10,7	0,9	6,97	Gharby <i>et al</i> (2013)
Picual	Espanha	11,7	1,0	2,2	79,7	3,2	0,4	24,75	Beltrán <i>et al</i> (2004)
Picual	Espanha	10,5	----	2,9	79,2	5,1	0,8	15,52	Aparicio <i>et al</i> (2002)
Picual	Portugal	12,9	1,2	2,5	74,1	5,5	0,8	13,44	Baer (2013)*
Picual	Argentina	13,8	1,7	2,5	71,9	7,7	1,0	9,34	Rondanini <i>et al</i> (2011)
Gemlik	Turquia	14,2	1,5	3,2	70,9	9,0	0,4	7,90	Gurdeniz <i>et al</i> (2008)
Memecik	Turquia	13,8	1,1	2,1	69,6	12,3	0,4	5,68	Gurdeniz <i>et al</i> (2008)
Verdeal T	Portugal	10,0	0,4	2,8	81,0	2,9	0,6	23,0	Matos <i>et al</i> (2007)

*Dados não publicados

Os resultados apresentados são valores médios obtidos muitas vezes em várias campanhas e diferentes estados de maturação e condições edafo-climáticas. De realçar as diferenças no perfil ácido na mesma cultivar em diferentes áreas geográficas, de acordo com o verificado por vários autores. A insaturação tende a aumentar com a latitude e o conteúdo em ácido oleico a diminuir com o aumento da temperatura na altura da formação do azeite no fruto. Em algumas amostras não se

cumprem os limites referidos na legislação europeia. A última coluna refere-se à relação ácido oleico/ ácido linoleico que tende a ser característica para uma dada cultivar numa determinada região. Confirmando o que diz Zarrouk *et al* (2009), observa-se, para a maioria das cultivares, uma diminuição do teor de ácido oleico e um aumento das percentagens dos ácidos palmítico e linoleico em relação aos valores obtidos nos azeites extraídos de azeitonas cultivadas nos seus locais de origem.

2.4.2 – Fração insaponificável

O azeite virgem é um alimento funcional que, para além do seu elevado conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados contém múltiplos componentes menores com propriedades biológicas (Covas *et al*, 2006) que contribuem, em grande parte, para a sua acção benéfica no plano da saúde e para manter a qualidade química e organoléptica do azeite (Montignac, 2001).

- **Ceras:** são ésteres de um álcool alifático monovalente superior com um ácido gordo de alto peso molecular e encontram-se no azeite virgem em pequena quantidade, provenientes dos tegumentos das sementes e epicarpos dos frutos. Durante a conservação do azeite, as ceras decompõem-se por hidrólise, encontrando-se, assim, álcoois livres na fração insaponificável (Curci, 2001).

- **Compostos fenólicos:** compostos fenólicos ou polifenóis é o termo usado para definir as moléculas que possuem um anel de benzeno, ou anel aromático, ligado a um ou mais grupos hidroxílicos (ésteres, metil ésteres, glucósidos, entre outros). São, geralmente, metabolitos das plantas, derivados da fenilalanina ou tirosina, tendo sido já identificados cerca de 8000 compostos individuais que vão desde ácidos fenólicos simples, derivados do ácido benzoico ou ácido cinâmico, até à família complexa dos flavonoides e taninos (Soto-Vaca *et al*, 2012).

A maior parte dos compostos fenólicos encontra-se na natureza numa forma conjugada, esterificados nos glucósidos e, são reações naturais de oxidação e de hidrólise que ocorrem nos frutos que provocam a sua libertação. Estes compostos estão relacionados com a qualidade sensorial e nutricional dos vegetais frescos e processados devido à formação/ alteração da cor e do “flavour” e à perda de

nutrientes. A atividade antioxidante destes compostos é de grande importância para a indústria alimentar (Gouveia, 1995; Tsimidou, 1998).

O azeite virgem é o único óleo vegetal com quantidades apreciáveis de substâncias fenólicas naturais, que lhe conferem o gosto amargo e frutado e contribuem, em grande parte, para a sua resistência à oxidação (Gouveia, 1995). Estes compostos têm a capacidade de doar um átomo de hidrogénio a um radical lipídico formado durante a fase de propagação da reação de oxidação contribuindo, assim, para a estabilidade do azeite. Também complexam os metais, tornando-os inativos como catalisadores da reação (Morelló *et al*, 2004; Ribeiro, 2005).

De acordo com Owen *et al* (2000), a maior parte dos compostos fenólicos encontrados no azeite virgem pertencem a três diferentes classes: fenóis simples (hidroxitirosol, tirosol); secoiridoides (oleuropeína, aglicona do ligstrósido e os seus respetivos derivados descarboxilados) e os lignanos ((+)-1-pinoresinol e o (+)-1-hidroxipinoresinol).

Os compostos fenólicos maioritários no azeite virgem são os secoiridoides (oleuropeína, agliconas da oleuropeína e derivados, agliconas do ligustrósido e derivados, derivados do p-hidroxifeniletanol), álcoois fenólicos, ácidos fenólicos e hidroxi-cromanos (Ribeiro, 2005; Haddada *et al*, 2008).

Os fenóis livres, presentes no azeite virgem, são muito numerosos: fenóis ácidos mono, di e trihidroxilados e fenóis neutros como ésteres e éteres. Os mais conhecidos são as tetrahidroxiflavonas, luteolina, apigenina e glucósidos; os ácidos cinâmicos e seus derivados, ácido cafeico (3,4-hidroxicinâmico), ácido p-cumárico e verbascosido; os ácidos fenólicos, vanílico, p-hidroxibenzóico, siríngico (4-hidroxifeniletanol) e hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), que são os mais abundantes e característicos do azeite virgem (Gouveia, 1995).

O último grupo de fenóis encontrados no azeite são os lignanos, sendo o (+)-1-pinoresinol e o (+)-1-hidroxipinoresinol, os lignanos mais frequentes (Servilli *et al*, 2002).

De acordo com Gutiérrez *et al* (2001) e Aparicio *et al* (2002), o poder antioxidante dos compostos fenólicos existentes no azeite virgem é devido essencialmente ao hidroxitirosol e à aglicona da oleuropeína, embora compostos como o (3,4-dihidroxifenil) etanol, (p-hidroxifenil) etanol e ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico e ácido vanílico também contribuam para a estabilidade do azeite virgem.

Velasco *et al* (2002) concluem que a contribuição dos compostos fenólicos para a estabilidade do azeite não é simples nem está diretamente relacionada com o conteúdo em polifenóis totais. Aparentemente, a contribuição final para a estabilidade pode depender de um efeito sinérgico com outros compostos ou com algumas outras características relacionadas com a cultivar.

O conteúdo em compostos fenólicos é um fator importante a considerar quando se avalia a qualidade de um azeite virgem, uma vez que estes compostos têm uma forte atividade antioxidante e contribuem significativamente para a sua grande estabilidade. Os compostos fenólicos possuem propriedades anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias no organismo humano e contribuem para as propriedades sensoriais dos azeites virgens conferindo amargor e adstringência (Ouni *et al*, 2011).

De acordo com o mesmo autor, a concentração e composição fenólica dos azeites virgens é fortemente afetada por fatores agronômicos e tecnológicos, como a cultivar, região, clima, grau de maturação das azeitonas, época da colheita e processo de extração, podendo a concentração de compostos fenólicos no azeite virgem variar entre 50 e 800 mg/ kg.

Servilli *et al* (2002) referem que a concentração fenólica do azeite virgem parece ser grandemente afetada pela disposição e distribuição de água durante o ciclo vegetativo da oliveira.

- **Compostos voláteis e aromáticos:** a fragância e o sabor característicos do azeite virgem devem-se a um certo número de compostos orgânicos voláteis e alguns compostos fenólicos, muitos dos quais normalmente presentes numa concentração baixa. Estes compostos voláteis podem ser usados como indicadores da qualidade do

azeite, da produção de compostos característicos de azeites defeituosos, na detecção de adulterantes e na identificação da cultivar de azeitona (Lorenzo *et al*, 2002). O seu conteúdo é variável com a cultivar, região geográfica, grau de maturação e método de extração (Baccouri *et al*, 2008) Até à data foram identificados cerca de 280 compostos do aroma do azeite virgem (Boskou *et al*, 2006), de natureza química muito variada, entre os quais se encontram hidrocarbonetos saturados, insaturados, aromáticos e terpénicos; álcoois; aldeídos; ésteres; fenóis e derivados; terpenos oxigenados e derivados do furano. Porém, os compostos realmente responsáveis pelas notas olfativas características do azeite virgem representam apenas uma fração do total destes compostos. De facto, se por um lado, nem todos os componentes identificados têm odor, por outro lado alguns destes compostos foram encontrados no azeite em concentração tão baixa que se supõe que a sua contribuição para o aroma global seja pequena (Ribeiro, 2005; Ruiz-Samblàs, 2012). Assim, existem vários factores químicos como a volatilidade, carácter hidrofóbico, tipo e posição dos grupos funcionais que estão mais relacionados com a intensidade do odor de um determinado composto volátil do que a sua concentração.

Ruiz-Samblàs (2012) refere que os principais compostos orgânicos voláteis referidos no azeite virgem são compostos voláteis de forma geral C6 e C5, como por exemplo o hexanal, o trans-2-hexenal e o hexano-1-ol. Estes compostos são originados a partir dos ácidos gordos polinsaturados através de uma cascata de reacções denominadas de mecanismo da lipoxigenase e as suas concentrações no azeite dependem da actividade de cada uma das enzimas envolvidas. No entanto, podem ainda formar-se compostos orgânicos voláteis, geralmente associados com defeitos sensoriais a partir de outros mecanismos como na auto-oxidação dos ácidos gordos ou da actividade de enzimas exógenas provenientes de microorganismos (Kalua *et al*, 2007).

A formação destes compostos dá-se principalmente nos cloroplastos, a partir da oxidação dos ácidos gordos através de mecanismos intracelulares biogénicos (Kalua *et al*, 2007). Alguns destes compostos estão presentes nos tecidos intactos dos frutos e outros são formados durante a destruição da estrutura celular nas etapas de extração do azeite, devido a reacções enzimáticas na presença de oxigénio (Kalua *et al*, 2007). Quando a membrana lipoproteica, que cobre e protege as gotas de azeite, entra em

contacto com os cloroplastos, os compostos voláteis ligam-se ao substrato lipídico (Gouveia, 1995).

Os compostos voláteis e fenólicos são assim largamente responsáveis pelo “flavour” dos azeites virgens e determinantes na preferência dos consumidores (Gómez-Rico *et al*, 2009)

- **Dialcoóis triterpénicos:** estes compostos estão presentes numa quantidade que varia entre 500 e 3000 mg/Kg, sendo os dois principais álcoois triterpénicos existentes no azeite virgem o eritrodiol e o uvaol. A sua concentração depende essencialmente da cultivar situando-se, no caso do eritrodiol entre 19 e 69 mg/Kg (Ghandari *et al*, 2012). Os teores de eritrodiol e uvaol são usados como parâmetros de qualidade. Um teor elevado destes diálcoois triterpénicos (superior a 4,5%) é um indicativo de azeites ou óleos obtidos por solventes e pode ser um indicativo de adulteração do azeite virgem (Grob *et al*, 1990). Segundo o Regulamento (EU) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro, anexo I, o limite máximo de eritrodiol e uvaol é de 4,5% para todas as categorias comerciais de azeite (azeite virgem extra e azeite virgem).

- **Esteróis vegetais:** os esteróis vegetais incluem a maior parte dos compostos insaponificáveis do azeite. Derivam do esqualeno e formam um grupo de triterpenos. O conteúdo de esteróis no azeite virgem varia entre 1000 e 2300 ppm e inclui compostos como brassicasterol, stigmasterol, campesterol, delta-7-stigmastenol e β -sitosterol. O β -sitosterol é o esteroide mais abundante correspondendo a cerca de 90% do teor total de esteróis existentes no azeite virgem (Canabate-Díaz *et al*, 2007). Esta composição é afectada pela cultivar, altura da colheita, grau de maturação, tempo de armazenamento dos frutos antes da extração e método de extração do azeite (Boskou *et al*, 2006). Os esteróis vegetais são estruturalmente semelhantes ao colesterol, com modificações na cadeia lateral que incluem a adição de uma dupla ligação e/ou um grupo metílico ou etílico (Sivakumar *et al*, 2006). A acção destes compostos na diminuição do nível de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue deve-se à interferência com a solubilização do colesterol nas miscelas intestinais, diminuindo a sua absorção. Possuem ainda algum efeito anticancerígeno, propriedades anti-inflamatórias e actuam como moduladores do sistema imunitário (Quillez *et al*, 2003).

- **Hidrocarbonetos:** formam-se como produtos colaterais durante a síntese dos ácidos gordos e compreendem o esqualeno (12 a 75% do total da matéria insaponificável) e o β -caroteno, de ação vitamínica A e antioxidante com teores que podem variar entre 0,3 a 3,7 mg/ Kg de azeite (Gouveia, 1995). O azeite virgem é, entre os óleos vegetais, aquele que contém a maior quantidade de esqualeno, sendo este composto um precursor bioquímico dos esteróis vegetais e do colesterol (Harwood *et al*, 2000). O teor de esqualeno no azeite virgem é especialmente elevado quando comparado com outros óleos e gorduras usados na alimentação, podendo atingir cerca de 0,7% (7 mg/g). É considerado um componente importante na dieta mediterrânica devido ao seu potencial preventivo contra o cancro. Uma ingestão diária de cerca de 40g de azeite virgem fornecem a quantidade necessária de esqualeno para que haja um efeito inibitório considerável contra o desenvolvimento do cancro (Newmark *et al*, 1999). Este hidrocarboneto apresenta ainda um efeito fotoprotectivo da pele contra os raios solares devido à sua acção antioxidante como filtro biológico contra o oxigénio singulete (Owen *et al*, 2000).

- **Pigmentos:** Fenómenos de partição implicados no processo de extração do azeite virgem determinam a distribuição dos pigmentos da azeitona entre a fase sólida (bagaço) e as fases líquidas (água e azeite). Devido à natureza hidrofílica das antocianinas e à natureza lipofílica dos pigmentos dos cloroplastos, os primeiros ficam retidos no bagaço e na água de vegetação, passando as clorofilas e carotenóides para a fase oleosa (Gámbaro, 2014). A cor do azeite virgem é, assim, devida à presença de pigmentos, como as clorofilas e os carotenoides (Kiritsakis e Christie, 2003), estando as tonalidades esverdeadas associadas a um teor mais elevado de clorofilas e as tonalidades amareladas ou douradas ao conteúdo em carotenoides (Costa, 2012).

Apesar da cor do azeite não se encontrar entre os critérios de classificação dos azeites virgens (Gámbarro *et al*, 2014), o papel destes pigmentos na cor do azeite virgem é altamente significativa, uma vez que é a primeira característica sensorial a ser avaliada pelos consumidores. De facto, existem consumidores que se sentem mais atraídos por azeites verdes, mais ricos em clorofilas, e outros que preferem os azeites mais amarelados, ricos em carotenoides e feofitinas (Cerretani *et al*, 2008).

Os carotenoides são polisoprenóides de hidrocarbonetos, álcoois ou ácidos carboxílicos e são lipossolúveis. Contêm um número considerável de ligações duplas conjugadas, o que lhes confere a cor amarela, laranja ou vermelha. Compreendem quatro grupos principais: os carotenos (hidrocarbonetos da série C₄₀), as xantofilas (derivados hidroxilados ou cetónicos) e, ainda, os ácidos carotenoides e os ésteres xantofílicos. Os carotenoides mais importantes são os α , β e γ -carotenos e o licopeno, todos com a fórmula molecular C₄₀H₅₆ (Gouveia, 1995).

Os principais carotenoides presentes no azeite virgem são o β -caroteno, a luteína, a violaxantina e a neoxantina. Estes compostos, em particular o β -caroteno, são eficientes antioxidantes. Normalmente o conteúdo total de carotenoides varia entre 1 e 20 mg/ Kg de azeite, encontrando-se o β -caroteno numa concentração que varia entre 0,5 e 4mg/ Kg (Morelló *et al*, 2004). O seu efeito antioxidante faz-se sentir para concentrações superiores a 1mg/ Kg (Gouveia, 1995).

De acordo com Ninfalli *et al* (2002), o β -caroteno aumenta marcadamente a estabilidade do azeite virgem exposto à luz solar ou fluorescente, uma vez que a molécula é capaz de bloquear o oxigénio singulete, retardando o mecanismo da foto-oxidação. Este efeito deriva da longa cadeia de duplas ligações conjugada da molécula (Costa, 2012).

Os pigmentos verdes do azeite virgem identificam-se com clorofilas. Contêm o chamado núcleo porfirínico, com um átomo de magnésio no centro. Este núcleo é constituído por quatro anéis pirrólicos azotados, complexados com magnésio e ainda com dois grupos éster (Gouveia, 1995).

As clorofilas a e b encontram-se na natureza numa proporção 3:1 e diferem nos substituintes do carbono C-3. Enquanto, na clorofila a, o anel porfirina contém um grupo metil (-CH₃), na clorofila b contém um grupo aldeído (-CHO) (Batinas, 2006). Ao degradarem-se, as clorofilas a e b perdem o ião magnésio e dão origem às respetivas feofitinas a e b (Gouveia, 1995).

A ação pro-oxidante dos compostos clorofilinos é, por ordem decrescente: feofitina b, feofitina a, clorofila b e clorofila a) (Costa, 2012).

A clorofila, que funciona como antioxidante na ausência de luz, apresenta um efeito fotocatalítico, acelerando a oxidação, assim que é exposto à luz. Na presença de luz, os pigmentos clorofilinos ativam o oxigênio para o estado singulete – oxigênio ativado – permitindo a foto-oxidação ou adição direta de oxigênio às cadeias de ácidos gordos. A foto-oxidação é mais rápida do que a auto-oxidação pelo que a presença das clorofilas no azeite é geralmente assinalada por um efeito pro-oxidante (Henriques *et al*, 2001).

Na figura 4 apresentam-se as estruturas dos principais pigmentos presentes no azeite.

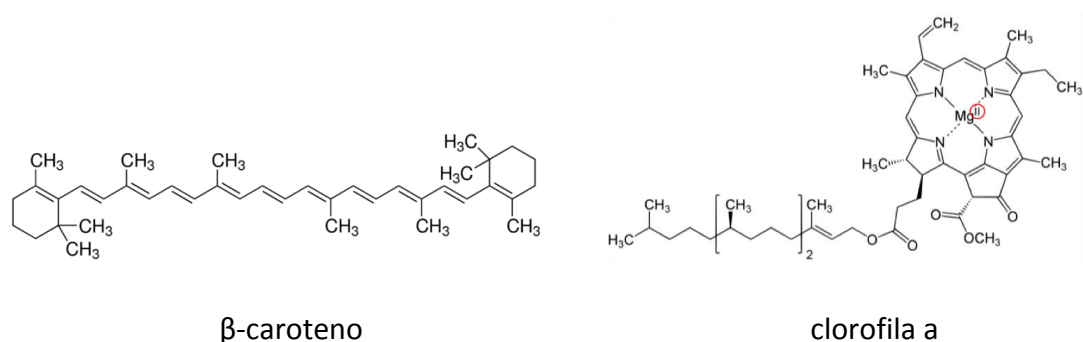


Figura 4 Estrutura química das moléculas de β -caroteno e clorofila a (adaptado de Sigmaaldrich, 2015)

- **Tocoferóis:** os tocoferóis são antioxidantes de natureza fenólica, quase sempre na forma livre, mas podendo apresentar-se sob a forma esterificada com um ácido gordo. Embora na forma esterificada a sua solubilidade aumente nas gorduras, perdem contudo toda a atividade como antioxidantes. Os tocoferóis (α , β , γ e δ), além de atividade antioxidante, têm também atividade vitamínica E, que decresce pela ordem apresentada. O mais ativo é o tocoferol α , composto por um núcleo hidroxicromano, com um grupo hidroxilo fenólico responsável pela atividade antioxidante, e uma cadeia hidrocarbonada lateral saturada com 16 átomos de carbono. Possui três grupos metilo fixados no núcleo hidroxicromano, enquanto que os tocoferóis β e γ só têm dois e o δ só um (Gouveia, 1995).

Segundo Escuderos *et al* (2009), o termo vitamina E engloba não só os tocoferóis mas também os tocotrienóis α , β , γ e δ , que diferem em relação ao número e posição dos grupos metilo no anel cromanol. A estrutura dos tocotrienóis difere da dos tocoferóis por possuir três duplas ligações trans na cadeia hidrocarbonada. O autor refere que os tocotrienóis não estão presentes no azeite virgem e que apenas se quantificaram os

tocoferóis α , β e γ em percentagens que variam entre 52 – 87%, 15 – 20% e 7 – 23%, respetivamente. De acordo com Blekas *et al* (2002), o tocoferol α pode atingir uma concentração de cerca de 300 ppm, o que suporta a relação ideal vitamina E/ ácidos gordos polinsaturados que não deverá ser inferior a 0,5 mg de vitamina E por g de ácidos gordos polinsaturados. No azeite virgem este valor situa-se geralmente entre 1,5 e 2,0 enquanto que nos outros óleos vegetais raramente atinge o valor 0,5 (Viola *et al*, 2009).

A importância destes compostos é suportada pela evidência do seu papel na qualidade e autenticidade do azeite virgem e também pela sua contribuição para a saúde (Sayago *et al*, 2007).

De acordo com Deiana *et al* (2002), os tocoferóis contribuem para a capacidade antioxidante do azeite virgem e aumentam a estabilidade durante a fritura, protegendo-o da degradação termo-oxidativa. Previnem a foto-oxidação reagindo física ou quimicamente com o oxigénio singulete, aumentando assim a estabilidade oxidativa do azeite durante o armazenamento quando exposto à luz (Kamal-Eldin *et al*, 1996) Ghanbari *et al* (2012) refere a ação do tocoferol α protegendo o organismo contra os radicais livres, prevenindo distúrbios cutâneos, cancro e aterosclerose. O autor afirma não se conhecer ainda completamente o mecanismo de actuação destes compostos, parecendo haver uma relação sinérgica entre a ação antioxidante de alguns compostos fenólicos e dos tocoferóis.

Os trabalhos de Blekas *et al* (1995) parecem indicar que os compostos fenólicos polares são inibidores mais importantes nas fases iniciais da auto-oxidação, enquanto o tocoferol α se torna efetivo quando os produtos primários da auto-oxidação atingem uma concentração crítica.

Wagner *et al* (2000) testaram o efeito antioxidante da adição de quantidades crescentes de tocoferóis individuais (α , γ e δ) e de misturas destes compostos com concentrações relativas variáveis a um azeite virgem. Verificaram que, para todos os níveis crescentes de adição dos tocoferóis individuais considerados, houve um aumento significativo da estabilidade oxidativa. Este efeito foi mais pronunciado com o tocoferol γ . Já com a adição das misturas de tocoferóis o resultado não foi o mesmo. O

tocoferol α inibiu pronunciadamente o efeito antioxidante dos tocoferóis γ e δ . No entanto, as misturas de γ/δ apresentaram um efeito protetor mais pronunciado do que adicionados separadamente. Na figura 5 apresenta-se a estrutura molecular dos diferentes tocoferóis mencionados.

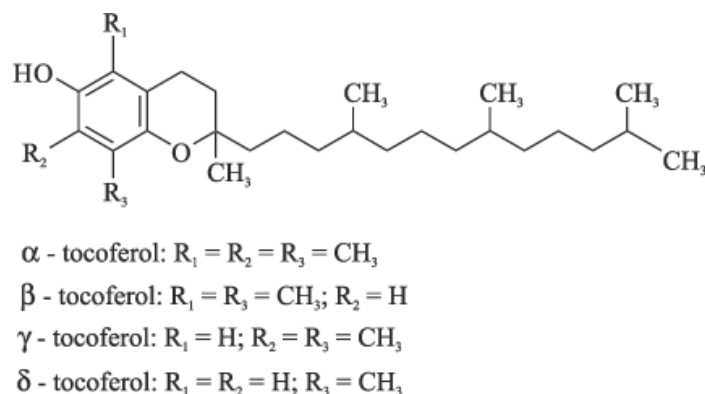


Figura 5 Estrutura química dos tocoferóis α , β , γ e δ . (Adaptado de Baer, 2006)

- **Vitaminas:** as vitaminas lipossolúveis também estão presentes no azeite virgem. As principais são a vitamina A ou retinol, a vitamina D ou calciferol, nas duas variantes D_2 e D_3 , a vitamina E ou tocoferol α e a vitamina K (Gouveia, 1995).

2.4.3 – Composição em antioxidantes de azeites virgens extraídos de diferentes cultivares

A composição em antioxidantes de um azeite virgem é altamente dependente, não só da cultivar, mas também do estado de maturação das azeitonas na altura da colheita, das características edafo-climáticas da região e das condições de extração e armazenamento do azeite virgem. No entanto, Tura (2007) confirmou, com os seus trabalhos, que a cultivar é o fator mais importante a influenciar o perfil antioxidante do azeite. Assim, a seguir, apresenta-se uma compilação, com base na bibliografia consultada, dos principais compostos antioxidantes de azeites virgens provenientes de diferentes cultivares de azeitona em diversas regiões, independentemente de outros fatores de variação.

Tabela 5 Composição em antioxidantes de azeites virgens provenientes de diferentes cultivares e origens geográficas

cultivar	região	Polif. T mg/ Kg	Hidroxi mg/ Kg	Tirosol mg/ Kg	tocof α mg/ Kg	tocof β mg/ Kg	tocof γ mg/ Kg	Referencia
Arbequina	Tunisia	108,3	3,38	7,72	164,6			Allalout <i>et al</i> (2009)
Arbosana	Tunisia	137,8	28,53	15,07	200,2			Allalout <i>et al</i> (2009)
Chemlali	Tunisia	112,0	4,21	9,54	329,0	10,43	4,83	Bacouri <i>et al</i> (2008)
Chétoui	Tunisia	454,5	47,62	24,33	326,0	5,78	14,46	Bacouri <i>et al</i> (2008)
Chétoui	Tunisia	321,7	1,59	2,72	362,9			Haddada <i>et al</i> (2008)
Edremit	Turquia	690,2		0,50	152,0	4,24	5,29	Yorulmaz <i>et al</i> (2013)
Frantoio	Espanha	680,5			155,0	1,84	1,21	Aguilera <i>et al</i> (2005)
Frantoio	Itália	290,5	1,79	10,51	199,7	4,54	9,66	Tura <i>et al</i> (2007)
Jarboui	Tunisia	189,6	0,23	0,96	267,8			Haddada <i>et al</i> (2008)
Koroneiki	Tunisia	236,5	11,37	14,61	294,5			Allalout <i>et al</i> (2009)
Leccino	Espanha	595,0			290,5	2,38	10,15	Aguilera <i>et al</i> (2005)
Leccino	Itália	160,9	1,12	4,39	241,0	2,93	6,78	Tura <i>et al</i> (2007)
Memecik	Turquia	757,3		1,09	308,9	13,60	12,26	Yorulmaz <i>et al</i> (2013)
Regina	Itália	292,1	2,04	1,96	257,6	8,20	4,04	Tura <i>et al</i> (2007)

Como se pode verificar na tabela 5, não existe um padrão para as diferentes cultivares, e a mesma cultivar em regiões diferentes apresenta resultados muito variados pelo que se pode inferir que, como referido anteriormente neste trabalho, para além da cultivar e das características geográficas, existem vários fatores importantes a contribuir para o conteúdo em antioxidantes de um determinado azeite virgem, como por ex^o o estado de maturação das azeitonas na altura da colheita, as condições edafo-climáticas, o modo de produção/ condução das oliveiras e as condições de extração e armazenamento do azeite.

2.5 – O AZEITE E A SAÚDE

As crenças populares, originárias nas civilizações de influência mediterrânica, atribuíam ao azeite virgem propriedades curativas e benéficas para a saúde que, com o avanço da investigação científica e tecnológica se confirmaram e demonstraram como certas. A lista de benefícios do consumo de azeite aumentou muito nos últimos anos, tornando o azeite virgem um produto natural de primeiro nível e a bandeira da dieta mediterrânica (Baer *et al*, 2014).

Os benefícios para a saúde do azeite virgem são bem conhecidos desde a Antiguidade. Já Hipócrates (460 – 37 a.C), considerado o pai da medicina, Galeno (131 – 200 d.C.) e

Dioscórides (fl 50 – 70 d.C.), fundador da Farmacognosia, redigiram tratados sobre o assunto, afirmando que:

“ O melhor efeito para a saúde obtêm-se de azeite novo, obtido de azeitonas verdes ou de variedades específicas.”

O azeite virgem é um alimento característico da dieta mediterrânica. Apesar de a sua composição ser complexa, a composição em ácidos gordos, especialmente o conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados e a presença natural de antioxidantes, dão a este produto inúmeras vantagens para a saúde, como por exemplo a diminuição da incidência de doenças coronárias e de certos tipos de cancro, particularmente do cancro da mama (Anastasopoulos *et al*, 2011; Leon *et al*, 2004), da próstata e colo-retal (López-Miranda *et al*, 2009). Erel *et al* (2013) reforçam a ideia relacionando as propriedades salutares do azeite virgem com três características: uma proporção elevada em ácidos gordos monoinsaturados, nomeadamente ácido oleico; a existência de poderosos anti-oxidantes, principalmente compostos fenólicos e a presença de uma variedade de compostos minoritários benéficos à saúde que incluem esteróis, carotenoides, esqualeno e tocoferóis. De facto, López-Miranda *et al* (2009) referem que os ácidos gordos monoinsaturados como nutriente, o azeite virgem como alimento e a dieta mediterrânica como padrão de alimentação estão associados com uma diminuição do risco de doenças cardio-vasculares, obesidade, síndrome metabólico, diabetes do tipo 2 e hipertensão. Ainda de acordo com os mesmos autores, os compostos fenólicos presentes no azeite virgem apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, prevenindo a peroxidação dos lípidos, induzindo alterações favoráveis no perfil dos lípidos, melhorando a função endotelial e mostrando propriedades antitrombóticas.

É sabido que o aumento do consumo de ácidos gordos monoinsaturados, em substituição de ácidos gordos polinsaturados, reduz o risco de aterosclerose, uma vez que favorece a circulação de lipoproteínas menos sensíveis à peroxidação (Tripoli *et al*, 2005). O consumo de azeite virgem favorece também a diminuição da pressão arterial, uma vez que o aumento do teor em ácido oleico nas membranas regula a estrutura lipídica das membranas, exercendo um efeito hipotensor (Terés *et al*, 2008).

De acordo com Tripoli *et al* (2005), a actividade biológica dos compostos fenólicos existentes no azeite virgem não se limita à sua capacidade anti-oxidante mas estende-se à interação com importantes sistemas enzimáticos, resultando em inibição da agregação plaquetária, redução da formação de moléculas pro-inflamatórias e inibição da utilização de oxigénio nos neutrófilos.

Landete (2012) refere que, devido à sua capacidade antioxidante, os compostos fenólicos inibem a oxidação das LDL com consequências significativas na aterosclerose e protegem o DNA de alterações oxidativas relacionadas com o desenvolvimento de alguns tipos de cancro e desenvolvidas com o avanço da idade. Para o autor alguns compostos fenólicos possuem ainda um efeito probiótico na flora do colon, estimulando o crescimento ou actividade de bactérias intestinais.

Foram descobertas ainda outras reações biológicas dos compostos fenólicos existentes no azeite virgem que podem ter um efeito importante na saúde; por exemplo, o ácido cafeico poderá exercer um efeito de proteção das células endoteliais, correlacionado não só com a sua ação como agente anti-oxidante mas também com a sua capacidade para bloquear o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , em resposta à oxidação das lipoproteínas (Tripoli *et al*, 2005).

Após as evidências demonstradas em vários ensaios realizados de que o consumo de azeite virgem reduzia o risco de incidência de doenças cardiovasculares devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos mono-insaturados, a FDA (Food and Drug Administration) nos EUA permitiu, em 2004, a alegação nos rótulos das embalagens que aconselhava ingestão diária de duas colheres de sopa (23g) de azeite virgem (Covas, 2008). Mais tarde, em 2011, após um estudo europeu, EUROLIVE, coordenado pela Dra. Covas em Barcelona, a EFSA (European Food and Safety Authority) autorizou a alegação de saúde acerca dos benefícios do consumo dos compostos fenólicos existentes no azeite virgem como proteção contra a oxidação das LDL. Estas alegações estão consagradas no Regulamento Europeu nº 432/2012 que estabelece uma lista de declarações autorizadas, em relação às propriedades saudáveis dos alimentos. Assim, na rotulagem dos alimentos, só se podem indicar e publicitar as propriedades que

aparecem na lista de alegações reconhecidas por este regulamento e que estão cientificamente comprovadas.

No caso dos azeites virgem extra e virgem, este regulamento reconhece três alegações que se podem utilizar e que estão relacionadas com as virtudes nutricionais de três elementos presentes na sua composição:

- “A substituição de gorduras saturadas por gorduras insaturadas na dieta contribui para manter níveis normais de colesterol sanguíneo. O ácido oleico é uma gordura insaturada.”

- “Os polifenóis do azeite contribuem para a proteção dos lípidos do sangue contra as oxidações indesejáveis.”

Esta alegação só pode ser utilizada para azeites que contenham, pelo menos, 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (por exemplo o complexo oleuropeína e tirosol) por 20g de azeite. Para poder ser feita a alegação, o consumidor deve receber informação de que o efeito benéfico é obtido com uma dose diária de 20g de azeite.

- “A vitamina E contribui para a proteção das células contra as oxidações indesejáveis.”

A quantidade diária recomendada para esta vitamina é de 10 mg por 100 ml, pelo que existem muitos azeites virgem e virgem extra obtidos de várias cultivares de azeitonas que facilmente ultrapassam este valor.

2.6 – A RASTREABILIDADE DO AZEITE VIRGEM

A rastreabilidade dos alimentos implica o controlo de toda a cadeia de produção, permitindo que o produto seja detetado em todas as etapas da produção até à sua origem, o que garante a segurança alimentar do consumidor. No caso do azeite, o aumento da procura de azeites virgem extra de elevada qualidade levou ao surgimento no mercado de produtos com características específicas, com origem em determinadas regiões, ou seja, azeites virgens com uma denominação de origem ou que incluem na

sua composição azeitonas de uma ou várias cultivares. Os azeites elementares ou monovarietais, extraídos apenas de uma cultivar, possuem características específicas relacionadas com essa cultivar; com os azeites virgens obtidos da combinação de várias cultivares pretende-se alcançar um determinado “flavour” ou aroma (Montealegre *et al*, 2010).

De acordo com o mesmo autor, o aparecimento das denominações e indicações de origem protegidas promoveu a existência de azeites rotulados de acordo com estes critérios. O regulamento 2081/92 criou os sistemas conhecidos como Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) para promover e proteger os produtos alimentares.

Para que um azeite virgem usufrua de uma Denominação de Origem Protegida tem que definir vários parâmetros como as cultivares, a origem geográfica, as práticas agronómicas, a tecnologia de extração e as características químicas e organoléticas (Gimenez *et al*, 2010).

A verificação das cultivares utilizadas para a obtenção de um azeite virgem pode contribuir para comprovar a sua origem, o que pode ter interesse no caso de azeites virgens monovarietais ou elementares e naqueles com Denominação de Origem Protegida, uma vez que a sua qualidade pode ser adulterada com outros azeites de menor qualidade (Breton, 2004).

Uma vez que a qualidade de um azeite virgem depende da cultivar de azeitonas de que é extraído, a extração de azeites de certas cultivares aumentou (Sanz-Cortes *et al*, 2003). A seleção das cultivares a utilizar é baseada na sua adaptação a diferentes condições climáticas e de solos. Além disso, enquanto algumas cultivares são características de uma determinada região, existem outras que podem ser encontradas em vários países (Japon-Lujan *et al*, 2006). Como consequência, uma cultivar pode ser cultivada e nomeada de diferentes maneiras em distintas regiões geográficas, o que torna a diferenciação das cultivares de azeitona que compõem os azeites virgens bastante complexa (Montealegre *et al*, 2010).

Atualmente os esforços têm estado focados na investigação de um ou mais compostos existentes no azeite virgem e que possam ser usados para diferenciar as cultivares de azeitonas (Montealegre *et al*, 2010). Estes marcadores de composição (substâncias que fazem parte da composição do azeite) incluem componentes maiores e menores como esteróis, compostos fenólicos, compostos voláteis, pigmentos, hidrocarbonetos, tocoferóis, ácidos gordos e triacilgliceróis que podem fornecer informação básica sobre as diferentes cultivares. Cada um destes parâmetros, com um poder discriminante variável, pode ser usado na rastreabilidade dos azeites virgens, de acordo com as cultivares utilizadas na sua obtenção (Arvanitoyannis *et al*, 2007).

Um dos principais objetivos do Conselho Oleícola Internacional (COI) é defender a imagem do azeite virgem e combater as fraudes, assegurando a autenticidade dos produtos e protegendo os consumidores. Uma das maneiras para o fazer é promover um esquema para o controlo da qualidade dos azeites vendidos pelos países membros do COI nos mercados importadores. O intuito é garantir que os azeites exportados estão definidos e classificados corretamente, que as suas características físico-químicas são verídicas e que cumprem os critérios de rotulagem. Este esquema foi estabelecido inicialmente em julho de 1991 nos Estados Unidos da América e no Canadá, onde foi assinado um acordo entre os principais exportadores de azeite dos países membros do COI e a Associação do Azeite da América do Norte (North American Olive Oil Association). Em 1993 estendeu-se à Austrália, onde foi assinado um acordo com a Associação Australiana do Azeite (Australian Olive Oil Association). Mais recentemente foi também celebrado um acordo com o Brasil e o Japão. Para evitar uma fragmentação, os vários acordos celebrados foram fundidos num único documento, conhecido pelo título oficial: “Acordo para o controlo da qualidade dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona vendidos nos mercados importadores”. Este acordo foi revisto em 2011 e assinado por muitas associações representantes dos produtores e exportadores dos países membros do COI e os importadores ou distribuidores que operam nos mercados alvo (COI, 2012).

Assim, o recente Regulamento de Execução (UE) nº 29/2012 da Comissão, de 13 de Janeiro de 2012, relativo às normas de comercialização do azeite, afirma a necessidade de estabelecer, a nível da União, um regime obrigatório de designação da origem,

limitado ao azeite virgem extra e ao azeite virgem, que obedeça a condições precisas. O regime facultativo que vigorou até 2009 revelou-se insuficiente para evitar a indução em erro do consumidor quanto às características reais dos azeites virgens neste domínio. Além disso, o Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios estabeleceu as regras de rastreabilidade aplicáveis a partir de 1 de janeiro de 2005. A experiência adquirida na matéria pelos operadores e pelas administrações públicas permitiu que a indicação da origem na rotulagem passe a ter carácter obrigatório no caso do azeite virgem extra e do azeite virgem.

As denominações de origem protegida da região do Alentejo

Na União Europeia, a certificação relacionada com a área geográfica tem grande importância económica, representando uma forma de otimização e diferenciação na comercialização de produtos agroalimentares (Simões-Lopes *et al*, 2006). Cultivares portuguesas com grande interesse na indústria de extração de azeite virgem são as responsáveis pelos azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP), onde predomina a cultivar Galega vulgar (Vaz-Freire *et al*, 2008).

Em Portugal existem seis zonas com Denominação de Origem Protegida para azeite virgem: DOP Moura, DOP Alto Alentejo, DOP Alentejo Interior, DOP Ribatejo, DOP Beira Interior e DOP Trás-os-Montes. A classificação DOP significa que o azeite foi extraído de acordo com as regras estipuladas pelo respetivo Agrupamento de Produtores no caderno de especificações referentes a: cultivares de azeitonas, condições de colheita e transporte para o lagar, condições de extração e características do produto final (Freitas, 2013).

Caracterizam-se, de seguida, as DOP do Alentejo.

- **Denominação de Origem Protegida Moura:** a região de Moura, na margem esquerda do rio Guadiana é muito conhecida pelo seu azeite e a DOP Moura encontra-se consagrada pelo uso. A produção de azeite de Moura era já conhecida pelos Romanos

e citada por Plínio (I século) que se admirava da arte do povo desta região no que respeita a olivicultura. Estrabão faz referência às exportações para Roma do magnífico azeite proveniente da planície do Alentejo (Qualifica, 2013).

Este azeite resulta da junção de três cultivares de azeitonas, nas seguintes proporções: Cordovil de Serpa, entre 35 a 40%; verdeal alentejana entre 15 e 20% e a cultivar Galega vulgar na percentagem restante (Qualifica, 2013). Os azeites de Moura têm baixa ou muito baixa acidez, são ricos em ácidos gordos monoinsaturados, muito frutados, amargos e picantes nos primeiros meses a seguir à sua extração e de cor amarelo-esverdeado. O aroma e sabor que lhe são próprios são devidos às cultivares Galega vulgar e verdeal alentejana. O alto teor de ácidos monoinsaturados provem principalmente da variedade Cordovil de Serpa (Qualifica, 2013).

Na extração deste azeite apenas se utilizam azeitonas colhidas em plena maturação (Paquete, 2009).

Produzido na área geográfica definida pelo Despacho nº 8/94, de 04/01 (freguesias de Póvoa de São Miguel, Amareleja, S. João Baptista, Stº. Agostinho, Stº. Amador, Safara, Stº. Aleixo., do concelho de Moura; Pias, Vale de Vargo, Vila Verde de Ficalho, Brinches, S. Maria, Salvador e Vila Nova de S. Bento, do Concelho de Serpa e Granja, do concelho de Mourão). A Denominação de Origem foi reconhecida pelo Despacho acima mencionado e registada e protegida a Denominação de Origem Moura pelo Regulamento (CE) nº 1107/96, de 12/06 (Qualifica, 2013).

- **Denominação de Origem Protegida Alentejo Interior:** na outra margem do rio Guadiana, na região dos azeites do Alentejo Interior, existem condições de solo e clima muito particulares, resultando num ambiente natural que privilegia o desenvolvimento da oliveira. É uma região com uma gama de solos variada, todos ricos em cálcio e potássio, que influencia o porte e a produção de azeitona. A concorrência dos factores pedo-climáticos com as variedades usadas e a existência percentual são determinantes para a produção de um azeite com características qualitativas diferenciadas em relação aos azeites obtidos em zonas relativamente próximas. Foram os fenícios e principalmente os romanos que introduziram a oliveira no Alentejo Interior, e que trouxeram melhorias para a plantação, enxertia e extração de azeite. As ruínas de

lagares, pesos de prensas e vestígios de fornos cerâmicos de ânforas oleárias constituem provas convincentes do fabrico de azeite neste Alentejo Romano (Qualifica, 2013).

O azeite tem uma coloração amarela dourada ou esverdeada, de aroma frutado suave de azeitona madura e/ ou verde e outros frutos, nomeadamente maçã e/ ou figo e grande sensação de doce. É obtido por processos mecânicos, a partir de frutos das cultivares Galega vulgar, com um mínimo de 60% e Cordovil de Serpa e/ou Cobreiros, com uma contribuição máxima de 40%. São toleradas outras cultivares num máximo de 5%, com exclusão absoluta das cultivares Maçanilha e Picual. As cultivares usadas apresentam características próprias devido à área geográfica de produção (Qualifica, 2013).

A área Geográfica de Produção (produção, transformação e acondicionamento) está circunscrita aos concelhos de Portel, Vidigueira, Cuba, Alvito, Viana do Alentejo, Ferreira do Alentejo e Beja e ainda nas freguesias de Aljustrel, S. João de Negrilhos e Ervidel, do concelho de Aljustrel; Entradas, do concelho de Castro Verde; Alcaria Ruiva, do concelho de Mértola e Torrão, do concelho de Alcácer do Sal, conforme Despacho nº 15 983/2001, de 04/07. A Denominação de Origem foi reconhecida pelo Despacho acima mencionado e registada e protegida a Denominação de Origem Alentejo Interior pelo Regulamento (CE) 148/07, de 15/02 (Qualifica, 2013).

- **Denominação de Origem Protegida Alto Alentejo:** Diz-se que os Visigodos herdaram a cultura da oliveira dos Romanos e estes possivelmente já a haviam encontrado na Península Ibérica. Os Árabes mantiveram a cultura e fizeram-na prosperar. Gama Barros esclarece que onde a reconquista cristã se realizou mais tardiamente foi precisamente onde a importância de cultura da oliveira era maior. O primeiro "Regimento do Ofício de Lagareiro" é de 1392 e refere-se à cidade de Évora (Qualifica, 2013).

Nesta região predomina a cultivar Galega vulgar, à qual se juntam outras cultivares como a carrasquenha e a redondil. Assim, este azeite DOP é obtido da junção das cultivares Galega vulgar, com uma contribuição mínima de 65%; das cultivares

azeiteira, Blanqueta, carrasquenha e redondil com um máximo de 5% e a cultivar Cobrançosa com um máximo de 10%, sendo interdita a cultivar Picual (Regulamento CE nº 708/2005, anexo II). Os azeites são ligeiramente espessos, frutados, com cor amarelo ouro, por vezes ligeiramente esverdeada, aroma e gosto suave (Qualifica, 2013).

A área geográfica de extração (localização dos olivais, extracção do azeite e seu acondicionamento) abrange os concelhos de Alter do Chão, Arronches, Avis, Borba, Campo Maior, Castelo de Vide, Crato, Estremoz, Elvas, Fronteira, Marvão, Monforte, Redondo, Portalegre, Sousel, Vila viçosa e a freguesia de Juromenha do concelho de Alandroal tal como definido no Desp. 61/94, de 21/01, tendo posteriormente passado a incluir os concelhos do Alandroal, Nisa e Reguengos de Monsaraz e algumas freguesias dos concelhos de Évora e de Mourão como definido no Desp. 15722/07, de 13/07. A Denominação de Origem foi reconhecida pelo Despacho 61/94, de 21/01 e a Denominação de Origem Norte Alentejano registada e protegida pelo Regulamento (CE) nº 1107/96, de 12/06 (Qualifica, 2013).

PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental do trabalho foi organizada em dois ensaios e as amostras de azeite virgem obtidas em lagares industriais de extração centrífuga de duas fases, a fim de aproximar as condições experimentais do trabalho com as condições reais atuais de colheita e extração de azeite virgem. O principal objetivo foi obter informação sobre os azeites virgens extraídos de cultivares de azeitona portuguesas que contribuam para a construção de uma base de dados, possibilitando a rastreabilidade dos azeites alentejanos. O primeiro ensaio foi dividido em três partes: na primeira parte analisou-se a composição média em ácidos gordos de azeites virgem extra obtidos de diferentes cultivares de azeitona em olivais situados nas regiões Norte, Centro e Sul do país durante três campanhas (2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012) e, na campanha 2011/2012, especificou-se a análise para a cultivar Galega vulgar. Na segunda parte do ensaio, com o intuito de aprofundar o tema da rastreabilidade geográfica, restringiu-se a área em análise ao distrito de Beja e procedeu-se à obtenção e análise de amostras de azeite virgem extra extraídas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação e obtidas em lagares situados nas margens esquerda e direita do rio Guadiana. As amostras foram obtidas na mesma campanha (2012/2013) e manteve-se o modo de produção: tradicional de regadio. Analisou-se essencialmente a variação na composição em ácidos gordos e em antioxidantes como compostos fenólicos e tocoferóis. Na terceira parte colheram-se amostras de solo nos seis locais analisados (três na margem esquerda e três na margem direita do rio Guadiana) com o propósito de testar a hipótese de Beltrán (2015) que afirma que a rastreabilidade geográfica do azeite virgem pode ser controlada através de espécies químicas, como por exemplo, elementos minerais vestigiais, que estão ligados a uma área de produção, sendo transferidos do solo para o azeite com variações mínimas. Analisou-se a composição mineral dos solos e a dos azeites virgens obtidos das azeitonas colhidas nos respectivos olivais.

No segundo ensaio acompanhou-se a maturação dos frutos da cultivar Cordovil de Serpa na campanha 2011/2012, extraindo-se o azeite semanalmente durante dez semanas. Manteve-se a zona geográfica: concelho de Moura e o método de extração (Abencor) e variou-se o modo de produção: biológico *versus* tradicional de regadio. O

objetivo foi verificar as diferenças na composição dos azeites obtidos, essencialmente em relação à composição em antioxidantes e ácidos gordos. O azeite foi extraído sempre das mesmas árvores durante as dez semanas, pelo que foi necessário, neste caso, proceder-se à extração laboratorial e não industrial. Foram colhidas amostras de solo nos dois olivais para tentar encontrar uma relação entre a composição do solo e a composição do azeite, principalmente em relação aos ácidos gordos e compostos antioxidantes. A confirmação desta hipótese contribuiria para o controlo da rastreabilidade geográfica dos azeites.

Todas as amostras de azeite analisadas nos dois ensaios foram extraídas no mesmo dia da colheita dos frutos e armazenadas em frascos de vidro escuro de 500 ml de capacidade a -20°C até à data das análises.

Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância e de técnicas de reconhecimento de padrões: análise de componentes principais.

Todos os métodos de análise referidos a seguir foram aplicados em, pelo menos, um dos ensaios e todas as determinações efetuadas em triplicado.

CAPÍTULO 3- MATERIAL E MÉTODOS

Além das análises efetuadas às amostras de azeite virgem nos dois ensaios, foram também realizadas análises às azeitonas no segundo ensaio, que permitiram o acompanhamento da maturação e a determinação das datas de colheita dos frutos. Neste capítulo enumeram-se todas as análises realizadas nos dois ensaios. Descrevem-se com mais detalhe as análises realizadas de acordo com métodos internos, que não seguem normas ou regulamentos europeus.

Os reagentes utilizados nas análises químicas realizadas no Laboratório de vinho e azeite do Instituto Politécnico de Beja (LVA) foram os seguintes: éter, etanol, fenoltaleína, carbonato de sódio, iodeto de potássio, ciclohexano, tiosulfato de sódio e hidróxido de sódio, grau p.a. – Panreac. N-hexano e metanol, grau p.a. - Fisher Scientific. Clorofórmio e ácido acético glacial, grau p.a. - Fisher Chemical. Iso-octano e trimetilpentano, para HPLC - VWR Chemicals. Reagente Folin-Ciocalteu, amido solúvel, grau p.a. e metanol grau para HPLC - Merck. Os padrões utilizados nas análises dos compostos fenólicos por HPLC foram adquiridos à Sigma-Aldrich com os seguintes graus de pureza: oleuropeína (98%), tirosol (99%), hidroxitirosol (98%), ácido cafeico (99%) e ácido gálico (98%). Estes compostos foram armazenados de acordo com as instruções até à data das análises: o tirosol e hidroxitirosol a -20°C, a oleuropeína e o ácido cafeico a uma temperatura entre 2° e 8°C e o ácido gálico à temperatura ambiente. Todas as outras análises foram realizadas em laboratórios exteriores certificados e os reagentes utilizados de acordo com o especificado.

3.1 – ÍNDICE DE MATURAÇÃO DOS FRUTOS

Segundo Henriques *et al* (2000), a qualidade do azeite depende de factores varietais, edáficos, climáticos, tecnológicos e agronómicos. Entre estes apresenta considerável importância o estado de maturação da produção no olival, o qual tem vindo a ser definido de acordo com diversos critérios. Rotondi (2004) refere a existência de vários

estudos que indicam que, durante a maturação, a concentração de compostos fenólicos aumenta até um valor máximo quando se atinge uma pigmentação intermédia dos frutos, diminuindo acentuadamente no decurso da restante fase de maturação. É assim necessário estabelecer um índice de maturação apropriado e específico para cada cultivar de azeitona que permita determinar a altura mais apropriada para a colheita.

Para acompanhamento da evolução da maturação das azeitonas, optou-se pela determinação da cor através do Índice de Maturação de Jaen, por ser um método expedito e facilmente aplicável no campo quando se pretende estabelecer o momento óptimo de colheita dos frutos. Esta análise foi realizada no laboratório da Cooperativa Agrícola de Moura e Barrancos.

Seguiu-se o procedimento descrito por Hermoso *et al* (1998):

Colheu-se, de cada árvore seleccionada, uma amostra de azeitona de cerca de 2 Kg, à altura do operador e nas 4 orientações da árvore. Uma vez homogeneizada a amostra, separaram-se 100 frutos, aleatoriamente, que se classificaram em 8 classes que vão de 0 a 7:

Classe 0 – pele verde intenso

Classe 1 – pele verde amarelada

Classe 2 – pele verde com manchas arroxeadas em menos de 50% do fruto

Classe 3 – pele rôxa em mais de 50% do fruto

Classe 4 – pele negra e polpa branca

Classe 5 – pele negra e polpa rôxa em menos de 50%

Classe 6 – pele negra e polpa rôxa sem chegar ao caroço

Classe 7 – pele negra e polpa totalmente rôxa até ao caroço

O Índice de Maturação é o somatório dos produtos do número de azeitonas de cada classe, dividido por 100. Assim, obtêm-se valores entre 0 (todos os frutos de cor verde intensa) e 7 (todos os frutos com a pele negra e a polpa rôxa até ao caroço).

Esta classificação foi feita em todas as amostras, imediatamente após a colheita. Utilizou-se uma faca para cortar longitudinalmente as azeitonas, permitindo a classificação nas classes 4, 5, 6 e 7.

O método estipula que o azeite se encontra totalmente formado quando o Índice de maturação atinge valores próximos de 3,5, estando a maioria dos frutos nas classes 2 e 3, alguns já com a pele negra (classe 4 ou superior) e poucos com a pele verde amarelada (classe 1).

3.2 – PERCENTAGEM DE ACIDEZ

A percentagem de acidez (expressa em % de ácido oleico) mede a quantidade de ácidos gordos que estão libertados da estrutura dos triacilgliceróis. Os ácidos gordos libertam-se da estrutura dos triacilgliceróis essencialmente devido a reações químicas de hidrólise ou lipólise resultantes da sobre maturação dos frutos, do ataque de pragas e doenças e ainda de métodos de colheita, transporte e armazenamento das azeitonas e de extração do azeite descuidados (Costa, 2012). O seu conhecimento contribui principalmente para a avaliação e classificação do azeite.

A determinação foi efectuada de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91, anexo II, alterado pelo Regulamento (CE) nº 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007, no laboratório de vinho e azeite do Instituto Politécnico de Beja (LVA).

3.3 – ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O índice de peróxidos define-se como a quantidade de oxigénio activo, expressa em miliequivalentes, contida em um quilograma de gordura ou óleo.

Os hidroperóxidos são os primeiros produtos resultantes da sua oxidação formando-se, pelo menos durante as etapas iniciais, a um ritmo paralelo à quantidade de oxigénio absorvido. (Ruiz *et al*, 1991) No entanto, como refere Gouveia (1995), os hidroperóxidos são compostos muito instáveis que, por decomposição, dão origem a

produtos carbonílicos, com moléculas pequenas, que modificam o “flavour” das gorduras, mas que não são mensuráveis por este índice. Portanto, o índice de peróxidos, só constitui uma medida útil do grau de oxidação no princípio da reacção.

Para a sua determinação utilizou-se a metodologia de análise descrita no Regulamento CEE nº 2568/91, anexo III, alterado pelo Regulamento (CE) nº 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007. A análise foi realizada no laboratório de vinho e azeite do Instituto Politécnico de Beja (LVA).

3.4 – ÍNDICES ESPECTROFOTOMÉTRICOS (K232 e K270)

Este método é utilizado como medida dos produtos secundários da oxidação, formados a partir da decomposição dos hidroperóxidos.

Durante a oxidação formam-se radicais livres nos grupos metilenos entre as ligações duplas. Esta situação é, no entanto, instável, e conduz à formação de sistemas conjugados, mais estáveis, constituídos por duas ligações duplas separados apenas por uma ligação simples, que absorvem preferencialmente a um comprimento de onda de 232 nm. Os compostos carbonílicos (produtos secundários da oxidação), nos quais os grupos cetonas estão conjugados com as ligações duplas, têm o máximo de absorção a cerca de 270 nm (Gouveia, J., 1995)

A análise foi realizada no LVA, de acordo com o Regulamento CEE nº 2568/91, anexo IX, alterado pelo Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2000 num espectrofotómetro da marca Hitachi, modelo U-2000.

3.5 – VISCOSIDADE

A viscosidade de um líquido traduz a sua resistência ao fluxo e surge das forças intermoleculares. A viscosidade geralmente diminui à medida que a temperatura sobe pois as moléculas têm mais energia a temperaturas elevadas. Quanto maior a viscosidade de um líquido, mais lentamente ele flui (Jones *et al* 1999). A viscosidade do azeite poderá estar relacionada com a sua composição em ácidos gordos.

A determinação foi realizada no LVA utilizando um viscosímetro da marca Thermo Haake VT550, com sonda MV DIN e o banho a uma temperatura de 20°C. Um determinado volume de amostra, necessário ao intervalo de medição dos sensores é colocado no recipiente onde se encontra um rotor que roda a uma velocidade pré-definida. A substância a ser medida exerce uma resistência a este movimento de rotação (devido à sua viscosidade) que se evidencia como um valor de binário (de travagem) aplicado no eixo de medição viscosímetro. Um computador acoplado ao sistema calcula os valores de medição relevantes que são automaticamente avaliados a partir do software instalado.

3.6 – PIGMENTOS

O azeite virgem possui uma cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo do estado de maturação dos frutos e da composição e conteúdo total de pigmentos presentes nas diversas cultivares de azeitonas. As tonalidades esverdeadas do azeite estão associadas a maiores teores em clorofilas e as tonalidades alaranjadas aos carotenoides. Os pigmentos clorofilinos tendem a decrescer ao longo da maturação (Conceição *et al*, 2003).

Os principais carotenoides presentes no azeite são a luteína, o β -caroteno, a violaxantina e a neoxantina. Os carotenoides, em particular o β -caroteno, são eficientes antioxidantes. Normalmente, o conteúdo total de carotenoides varia entre 1 a 20 mg/kg (Santos, 2009).

Psomiadou e Tsimidou (2001) refere que, para além de dependerem da cultivar e do estado de maturação, existem marcadas diferenças na composição de pigmentos do azeite virgem em relação à origem geográfica das azeitonas.

A determinação dos pigmentos clorofilinos e carotenóides efectuou-se no LVA, de acordo com Minguez-Mosquera *et al.*, (1991), a partir da leitura espectrofotométrica de uma solução de azeite em ciclohexano, a 670 nm e 470 nm.

Os resultados expressam-se em mg de clorofila / kg de azeite e mg de carotenoides / kg de azeite, respetivamente:

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

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

Em que:

A = absorvência lida

d = espessura da célula espectrofotométrica (1 cm).

As leituras das absorvências foram realizadas no LVA num espectrofotómetro UV/VIS da marca Hitachi, modelo U-2000, usando células de quartzo.

3.7 – ESTABILIDADE OXIDATIVA

A estabilidade oxidativa de um azeite dá-nos ideia do seu período de vida. Existem vários métodos que permitem fazer esta avaliação, entre os quais se encontram os

testes de condutividade. Segundo Morales *et al* (2000), estes testes baseiam-se na decomposição dos hidroperóxidos com formação de ácidos gordos de cadeia curta que alteram a condutividade da água. Os ácidos, que se produzem em maior quantidade quando o azeite é aquecido a temperaturas iguais ou superiores a 100°C, são o ácido acético e o ácido fórmico. Existem vários métodos que se baseiam neste princípio, entre os quais o Rancimat. De acordo com Gouveia, J. (1995), o fim do período de indução é indicado pelo começo do aumento exponencial da condutividade, devido à dissolução, na água, dos ácidos carboxílicos, formados durante o processo de oxidação. Os resultados, expressos em horas, referem-se ao momento em que a curva de condutividade inflecte e que coincide com o termo do período de indução. Este período mede-se pelo tempo decorrido entre o momento em que a amostra atingiu a temperatura desejada e o momento em que os produtos de oxidação se começam a desenvolver exponencialmente. Corresponde ao momento em que existe maior absorção de oxigénio e deterioração do “flavour”.

A análise realizou-se no laboratório de estudos técnicos do Instituto Superior de Agronomia (LET) de acordo com a NP 4158 de 1991, utilizando um equipamento Rancimat Metrohm 679 .

3.8 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos são considerados os principais compostos com actividade antioxidante presentes no azeite, dada a sua capacidade de doar um átomo de hidrogénio ao radical lipídico formado durante a fase de propagação da oxidação dos lípidos, contribuindo, assim, para a estabilidade do azeite. (Ribeiro, 2005). De acordo com Rotondi (2004), nos últimos anos, os compostos fenólicos têm atraído muita atenção devido às suas propriedades antioxidantes e aos seus benefícios para a saúde, consequência da sua atividade biológica na prevenção das doenças cardiovasculares e de alguns tipos de cancro.

O teor de compostos fenólicos no azeite virgem pode oscilar entre 50 e 1000mg/kg (Santos, 2009), dependendo maioritariamente da cultivar e do estado de maturação dos frutos, mas também das características edafo-climáticas e do modo de processamento durante a extração e armazenamento do azeite.

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o procedimento interno do LVA que se baseia na leitura espectrofotométrica das absorvências a 725 nm após reacção com solução de Folin-Ciocalteau.

O procedimento foi o seguinte:

1 – Preparação da solução referência:

Para um balão de 25 ml mediram-se 14 ml de água destilada, 2,50 ml de mistura metanol/água (6/4) e 1,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteau (Merck – ref^a.1.09001). Agitou-se e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se 4 ml de Na₂CO₃ a 20% e completou-se com água destilada.

2 – Técnica:

Pesou-se rigorosamente 10g de azeite (com 3 casas decimais) e dissolveu-se em 25 ml de n-hexano 99% pa. Transferiu-se para uma ampola de 100 ml. De seguida fizeram-se três extrações de 10 ml cada com a mistura de metanol/água (6/4), recolhendo-se os três extratos para dentro de um balão de 50 ml. Completou-se com água destilada, obtendo-se assim o extrato fenólico.

Para um balão de 25 ml mediu-se 14 ml de água destilada, 5 ml de extracto fenólico (medido com pipeta diferencial) e 1,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteau. Agitou-se energicamente e guardou-se no escuro durante 3 minutos. Após este tempo, juntou-se 4 ml da solução de Na₂CO₃ a 20%, completou-se com água e colocou-se ao abrigo da luz durante uma hora. Este procedimento foi feito em triplicado para cada amostra.

Ao fim deste tempo fez-se a leitura no espectrofotómetro UV/VIS da marca Hitachi, modelo U-2000, a 725 nm usando células de quartzo de 1 cm. Na célula de referência usou-se a solução indicada no ponto 1. A análise foi efectuada no LVA.

3 – Resultado:

A quantificação dos polifenóis totais foi feita através da fórmula:

O resultado expressa-se em mg/kg de azeite, com uma casa decimal, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Polifenóis Totais (mg/kg)} = \frac{(8,53993721 \times \text{leitura} - 0,24765388) \times 10 \times 25}{\text{peso da amostra}}$$

3.9 – COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

O azeite virgem é único entre os outros óleos vegetais devido ao elevado conteúdo em determinados compostos fenólicos que, juntamente com o alto teor em ácidos gordos monoinsaturados, lhe confere propriedades benéficas para a saúde e contribui para o seu característico sabor e estabilidade oxidativa (Dagdelen, 2013). A fração fenólica do azeite virgem consiste numa mistura heterogénea de compostos com diferentes propriedades químicas e impacto na qualidade do azeite, tais como: ácidos fenólicos, ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos, álcoois fenólicos, secoiridoides, lignanos e flavonoides (Herrera, 2013).

Por outro lado, o conteúdo fenólico do azeite virgem depende das condições edafo-climáticas onde se desenvolve o olival, pelo que a análise destes compostos, assim como a sua capacidade antioxidante, pode ter importância na discriminação das amostras de acordo com as diferentes zonas geográficas em estudo (Arslan, 2013).

Os compostos fenólicos eleitos para os ensaios são alguns dos mais representativos no azeite virgem.

Após extração da fração fenólica das amostras em estudo, a sua identificação e quantificação foi conseguida construindo-se curvas de calibração de 7 pontos com base nos compostos padrão correspondentes aos compostos analisados.

Procedeu-se à extração fenólica das amostras e à preparação dos diversos padrões com concentrações diferentes no LVA, de acordo com o método utilizado na Faculdade de Ciências Experimentais da Universidade de Huelva.

1- Preparação da amostra:

- a) Para um eppendorf de 2 ml pesar 0,5 g amostra e juntar 500 μL de solução metanol/água (80%/20%).
- b) Agitar 1 minuto no vortex.
- c) Centrifugar a 13400 rpm durante 5 minutos.
- d) Retirar 400 μL do sobrenadante e filtrar para outro eppendorf.
- e) Retirar deste filtrado 150 μL para o vial e completar até 500 μL , adicionando 350 μL de água ultra pura.
- f) Injetar 100 μL no HPLC.

2- Preparação das curvas padrão para os compostos fenólicos em análise:

Prepararam-se os padrões de ácido gálico, hidroxitirosol, ácido cafeico e oleuropeína com sete concentrações diferentes, construindo-se as curvas de calibração necessárias à identificação e quantificação destes compostos nas amostras de azeite em estudo.

Obtiveram-se as seguintes equações por regressão linear:

. Ácido gálico: $Y = 32818 X - 10377$; $R^2 = 0,9994$

. Ácido cafeico: $Y = 37782 X - 27150$; $R^2 = 0,9975$

. Hidroxitirosol: $Y = 7372,3 X - 1516,5$; $R^2 = 0,9991$

. Tirosol: $Y = 12743 X - 1897,1$; $R^2 = 0,9982$

. Oleuropeína: $Y = 2541,2 X - 5178,3$; $R^2 = 0,9958$

3 – Análise por HPLC:

A análise foi realizada no laboratório do Centro de Biotecnologia do Alentejo (CEBAL) com base na metodologia utilizada na Faculdade de Ciências Experimentais da Universidade de Huelva adaptada para as condições de análise e para a coluna usada no presente ensaio.

Os compostos padrão e as amostras foram injetados num cromatógrafo líquido de alta resolução da marca Merck Hitachi LaChrom, Modelo: L-7100, equipado com uma coluna Lichrocart, modelo 250-4 Purospher Star, de fase reversa RP 18, e ligado a um espectrofotómetro Merck Hitachi LaChrom, modelo UV-VIS L-7420, selecionado para um comprimento de onda de 280 nm. A temperatura foi de 25°C.

Os solventes utilizados foram os seguintes:

Solvente A: 5% de Metanol, 2% de ácido acético glacial e o restante de água ultra pura;

Solvente B: 81,3% de Metanol, 1,7% de ácido acético glacial e o restante de água ultra pura.

Os volumes de solvente foram usados em gradiente de acordo com o descrito na tabela 3.1.

Tabela 6 Gradiente de solventes utilizados na análise de HPLC

Tempo (minutos):	Solvente A (%):	Solvente B (%):	Fluxo (ml/min):
0,0	100	0	1,0
5,0	100	0	
25,0	60	40	
50,0	25	75	
70,0	0	100	
90,0	100	0	
100,0	100	0	

3.10 – TOCOFERÓIS (ALFA, BETA E GAMA)

Os tocoferóis constituem um grupo de antioxidantes lipofílicos e têm uma ação efectiva na inibição da oxidação lipídica (Haddada, 2008).

Tal como os compostos fenólicos, também os tocoferóis têm a sua principal ação antioxidante doando um átomo de hidrogénio aos radicais peroxídicos formados durante a etapa de propagação da oxidação e formando, conseqüentemente, um radical estável (Velasco *et al*, 2002) .

O mesmo autor refere que, apesar de competirem com os compostos fenólicos nas etapas iniciais da oxidação, a sua contribuição para a estabilidade do azeite virgem é considerada menos importante do que a destes compostos.

Os tocoferóis, especialmente o α -tocoferol, que representa cerca de 90 – 95% do total de tocoferóis, apresenta um comportamento dependente da cultivar durante o processo de amadurecimento das azeitonas (Yorulmaz, 2013).

O método utilizado para a determinação dos tocoferóis (alfa, beta e gama) nas amostras de azeite virgem foi o procedimento interno IT064 do LET e a análise realizada no mesmo laboratório. O método baseia-se na determinação dos tocoferóis naturais livres através de HPLC com um detector UV. Uma alíquota da amostra dissolvida num solvente orgânico (acetona) é injectada num sistema HPLC, sendo os diferentes tocoferóis separados de acordo com o seu coeficiente de partição. Os tempos de retenção dos diferentes tocoferóis são comparados com os de óleo de soja ou de uma mistura conhecida de tocoferóis.

O procedimento seguido foi o seguinte:

1 – Parâmetros da cromatografia líquida:

- a) Sistema de HPLC Perkin Elmer constituído por: bomba, injektor, detector e integrador-registador;
- b) Detector Perkin Elmer UV/ VIS LC 295 a 292 nm; sensibilidade 0,05 aufs, output 10 mV e atenuação 16;
- c) Coluna Lichrospher 100 RP₁₈ 5 m X 25 cm, marca Merck, ref^a 1.50212.0001;

- d) Fluxo 2 ml/ min; temperatura do forno: 24°C; Loop: 10 ml;
- e) Condições isocráticas: solução composta de 4% A + 96% B sendo
A = 0,25 ml de H₃PO₄ num balão de 50 ml completado com água destilada e B = 500 ml de acetonitrilo (para HPLC) + 500 ml de metanol (para HPLC).

2- Preparação da solução padrão stock de alfa-tocoferol:

- a) pesar rigorosamente 20 mg de padrão (padrão alfa-tocoferol Fluka, ref^a. 89550) num balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com acetona;
- b) pipetar 10 ml da solução padrão para um balão e evaporar a temperatura não superior a 30°C. Logo que o solvente esteja evaporado, pipetar para o balão 10 ml de metanol (grau HPLC) para dissolver o tocoferol;
- c) medir a absorvência desta solução a 292 nm e calcular a sua concentração, dividindo a leitura da absorvência por 0,0076;
- d) se o valor obtido não for 0,32 ou 0,33 preparar uma nova solução de padrão stock;
- e) Se o valor obtido for 0,32 ou 0,33 procede-se à preparação da solução padrão de trabalho e continua-se com a determinação.

3 - Preparação da solução padrão de trabalho de alfa-tocoferol:

- a) Pipetar 2ml da solução stock para um balão volumétrico de 25 ml e completar com acetona (grau HPLC). A concentração da solução de trabalho será de 0,32mg – 0,33mg/ 10 ml;
- b) Guardar a solução no escuro entre 0°C – 5°C.

3 - Preparação da amostra:

- a) Pesar rigorosamente cerca de 1g de azeite (precisão +/- 1mg) num balão volumétrico de 10ml e completar o volume com acetona.

4 - Determinação do teor de tocoferol:

- a) Injectar 30 µl da solução padrão de trabalho de alfa-tocoferol no sistema HPLC e registar a área do tocoferol.

- b) Injectar 10 µ l da amostra e identificar os tocoferóis presentes. Quantificar os picos obtidos.

5 - Resultados:

O teor de cada tocoferol é calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{tocoferol(mg/Kg)} = (As \times Cstd \times 1000) / (Astd \times P)$$

sendo:

As = média das áreas das amostras

Astd = média das 2 áreas do padrão alfa-tocoferol;

Cstd = concentração da solução padrão de trabalho (0,32 ou = 0,33);

P = peso da amostra em gramas.

A análise foi realizada no LET.

3.11 – ÁCIDOS GORDOS

De acordo com Haddada (2008) e com Garcia-González (2009), a composição em ácidos gordos de um azeite virgem varia consideravelmente devido a fatores genéticos e ambientais e tem sido muito usada como um parâmetro importante na sua caracterização e na sua identificação geográfica.

De acordo com Henriques (2000), a composição em ácidos gordos está fortemente relacionada com a resistência do azeite aos processos oxidativos, principalmente a relação ácidos gordos monoinsaturados/ polinsaturados, uma vez que, de acordo com Gutiérrez *et al* (2002), os ácidos gordos insaturados são os principais substratos no processo de auto oxidação. Tem também implicações nutricionais positivas devido, principalmente, ao seu conteúdo em ácido oleico (Haddada, 2008).

Este facto tem maior importância em cultivares em que o teor em compostos antioxidantes não é muito elevado (Henriques, 2000).

Esta análise foi efectuada no LET de acordo com o Reg. CEE nº 2568/ 91, anexo XA, usando um cromatógrafo gasoso Perkin-Elmer Autosystem.

3.12 – ANÁLISE DE ELEMENTOS VESTIGIAIS EM AMOSTRAS DE SOLO, AZEITE VIRGEM E BAGAÇO DE AZEITONA

A rastreabilidade geográfica do azeite virgem pode ser controlada por espécies químicas, como por exemplo elementos vestigiais, relacionadas com a área de produção.

No capítulo 5, a análise mineral dos elementos vestigiais nas amostras de solo, azeite virgem e bagaço de azeitona foram realizadas no Departamento de Química e Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências Experimentais da Universidade de Huelva. Foi utilizada a técnica de espectrofotometria de massa com plasma de acoplamento indutivo ou Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), uma variante das técnicas de análise por espectrofotometria de massa. A técnica de ICP-MS é uma técnica relativamente recente, caracterizada por uma elevada sensibilidade/baixos limites de detecção e que permite a determinação de um modo rápido de um grande número de elementos em níveis vestigiais.

As amostras de azeite virgem e bagaço de azeitona resultantes do processamento das azeitonas dos diferentes olivais e ainda amostras dos respectivos solos foram preparadas e digeridas num forno micro-ondas Anton Paar programável com um rotor segmentado XQ80.

Preparação das amostras de azeite virgem

Pesou-se 0,5 g de amostra directamente para o recipiente de digestão; adicionou-se 5 ml de ácido nítrico a 65% (v/v), 3 ml de peróxido de hidrogéneo e 1ml de ácido hidroclorídrico. Os parâmetros de operação do forno micro-ondas foram inicialmente uma rampa de 15 minutos até atingir 280°C e uma pressão de 80 bar; manutenção dos parâmetros durante 20 minutos com um nível mínimo de ventilação; posterior ventilação das amostras durante 15 minutos.

Após a digestão as amostras foram armazenadas a 25°C durante 12 horas e, posteriormente, diluídas com água ultra-pura até fazer 25 ml. Antes da análise por ICP-MS as amostras foram cuidadosamente agitadas.

Preparação das amostras de bagaço de azeitona

As amostras de bagaço de azeitona foram congeladas e liofilizadas a -80°C. Realizaram-se duas digestões sub-sequentes para dissolver as amostras antes da análise elemental. Na primeira digestão pesou-se 0,20g de bagaço liofilizado e adicionou-se 5ml de ácido nítrico a 65%, 1ml de peróxido de hidrogénio a 30%, 1ml de ácido hidrófluorídrico a 40% e 1ml de ácido hidróclorídrico a 30%. As amostras foram digeridas no forno micro-ondas Anton Par com uma rampa de 12 minutos até atingir 210°C e 40 bar, mantendo-se estes parâmetros por 20 minutos. Na segunda digestão adicionou-se 6ml de ácido bórico ao resíduo da primeira digestão e os parâmetros de digestão foram uma rampa de 5 minutos até atingir 210°C e 40 bar e a manutenção dos valores durante 15 minutos com um nível de ventilação mínimo, seguindo-se a ventilação das amostras por 15 minutos. Após a digestão as amostras foram armazenadas a 25°C durante 12 horas e diluídas com água ultra-pura até fazer 25 ml.

Preparação das amostras de solo

Usou-se o método descrito por De la Rosa *et al* (2001). As amostras de solo, previamente congeladas, foram moídas num moinho com vibração e varas de titânio, em condições de criogenia. Pesou-se 0,1g de amostra para um recipiente de PTFE/PFA (politetrafluoretileno/perfluoralcoxil) de 60 ml, adicionando-se 8ml de ácido hidrófluorídrico e 3ml de ácido nítrico. A mistura foi aquecida a 90°C durante 24 horas num sistema fechado (bomba). Passado este tempo a bomba foi aberta para evaporação do ácido e a mistura aquecida a 130°C. Adicionou-se 3ml de ácido nítrico, fechou-se a bomba e aqueceu-se a solução a 90°C durante 12 horas. Após este período, a bomba foi novamente aberta, evaporou-se o ácido e adicionou-se 3ml de ácido hidróclorídrico, fechou-se a bomba e a mistura foi novamente aquecida a 90°C durante 12 horas. Evaporou-se o ácido e recuperou-se o resíduo com ácido nítrico a 2% para um balão volumétrico de 100 ml.

Como elemento standard interno, foi adicionado o elemento ródio (Rh) a todas as amostras de solo, azeite virgem e bagaço de azeitona com uma concentração de 5 µg/l.

Análise por ICP-MS

Foram analisados 40 elementos, tendo sido determinada a sua concentração por espectrofotometria de massa com plasma de acoplamento indutivo (ICP-MS), utilizando um equipamento da marca Agilent 7700X, modelo G3281A. As condições de trabalho foram as seguintes: RF potência, 1,5 KW; taxa de fluxo de ar do plasma, 15 l/min.; taxa de fluxo de ar auxiliar, 0,9 l/min.; profundidade de amostra, 9,0 mm; temperatura da interface do spray, 2°C; taxa de fluxo da amostra, 400 µl/min. As determinações foram realizadas em duplicado. Os recipientes de níquel foram limpos entre cada utilização, com o mesmo programa operacional de digestão no micro-ondas, adicionando 7 ml de HNO₃ e enxaguados com água ultra-pura desionizada.

3.13 – ANÁLISE QUÍMICA DE SOLOS

Apesar de a nutrição mineral dos solos não ser tradicionalmente considerada um factor importante que afecta a qualidade do azeite, estudos recentes indicam que os macronutrientes no solo podem ter efeito em alguns compostos do azeite (Erel *et al*, 2013). Os diferentes modos de produção do olival, como por exemplo, produção em modo de produção biológico ou convencional, também podem ser importantes na justificação das diferenças obtidas na composição dos azeites analisados, uma vez que implicam diferenças na disponibilidade dos nutrientes existentes no solo para a planta.

No capítulo 6, a análise às amostras dos solos dos olivais em estudo, conduzidos em modo de produção convencional e em modo de produção biológico, foram realizadas no laboratório oficialmente autorizado pela Conselheira de Agricultura e Pescas, C + E Analítica, situado em Sevilha. As amostras de terra foram limpas de impurezas como pedras, ervas, folhas e enviadas embaladas em sacos plásticos de cerca de 3 Kg, de acordo com as recomendações do laboratório através de uma transportadora

rodoviária contratada. As determinações efectuadas e os métodos utilizados, constantes nos boletins enviados, foram os seguintes:

- pH e condutividade eléctrica: medição com electrodo em extracto aquoso 1:5;
- matéria orgânica: método Walkley-Black, matéria orgânica oxidável em dicromato de potássio;
- azoto total: método Kjeldahl, por destilação;
- cálcio e magnésio: espectrofotometria de absorção atómica de chama, em extrato 1:25 de acetato de amónio 1 N e pH 7;
- sódio e potássio: espectrofotometria de emissão atómica de chama, em extrato 1:25 de acetato de amónio 1 N e pH 7;
- fósforo e boro: espectrofotometria de ultravioleta-vísivel, em extrato 1:10 de Mehlich-3;
- ferro, cobre, zinco e manganês: espectrofotometria de absorção atómica, em extrato 1:10 de Mehlich-3;
- carbonatos e cálcio activo: calcímetro de Bernard;
- textura: método de Bouyoucos.

CAPÍTULO 4 – TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os tratamentos estatísticos usados dependem do ensaio e dos objectivos em causa, pelo que são justificados em cada ensaio. Todos os tratamentos e gráficos foram elaborados pelos “software” Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation, 2002) e Statistica 6.0 (StatSoft, 2001).

4.1 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA E ANÁLISE DE VARIÂNCIA A UM FACTOR

A estatística descritiva utiliza um conjunto de técnicas analíticas que tem por objectivo resumir os dados recolhidos numa dada investigação a relativamente poucos números e gráficos, calculando valores como a média e o desvio padrão das variáveis.

A análise de variância visa, fundamentalmente, verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente, comparando médias de diferentes populações para verificar se essas populações possuem médias iguais ou não, permitindo que vários grupos sejam comparados a um só tempo. É geralmente aplicada quando se quer decidir se as diferenças entre amostras observadas são reais (causadas por diferenças significativas nas populações observadas) ou casuais (decorrentes da mera variabilidade amostral). A análise parte do pressuposto que o acaso só produz pequenos desvios, sendo as grandes diferenças geradas por causas reais podendo, então, afirmar-se que os valores médios são diferentes.

Nos ensaios realizados os valores médios foram obtidos a partir de duas ou três amostras semelhantes (dependendo do ensaio) e, em cada amostra, foram utilizadas 3 réplicas laboratoriais. Assim, cada valor médio está associado a, pelo menos, seis repetições ($n = 6$). Para além das médias dos atributos foram determinados os desvios padrão, para incluir nas tabelas de resultados, bem como o intervalo de confiança a 95%, que foi usado para a apresentação gráfica das médias.

Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os valores médios obtidos para um determinado parâmetro, foi efetuado o teste de comparação de médias “ANOVA post hoc comparisons Scheffé contrasts”.

O teste ANOVA avalia em que medida duas fontes de variabilidade contribuem para a variação total dos dados: alguma variação resulta da diferença entre indivíduos dentro de cada grupo (variação residual ou variância dentro do grupo), enquanto a maioria da variação resulta das diferenças introduzidas pelos grupos (variância entre grupos).

4.2 – ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

4.2.1 – Análise em componentes principais

A análise em componentes principais (ACP) é uma técnica que tem por objectivo reduzir um grande número de variáveis experimentais a 2 ou 3 índices compostos, denominados componentes principais (CP), sem se perder muita informação. A ACP é baseada na combinação linear das variáveis experimentais com as variáveis artificialmente produzidas, CPs, formando um novo espaço ortogonal com um menor número de dimensões, uma vez que apenas incorpora as componentes principais significativas (Gardner, 1997; Sharma, 1996). A primeira componente é a que contém maior variância associada, seguindo-se a segunda e assim sucessivamente, até perfazer m-componentes, cuja soma da variância é igual à soma da variância das variáveis originais (100%). De facto, as m-variáveis originais têm valor próprio igual a 1, “pesam” todas o mesmo, enquanto que as m-componentes têm valor próprio diferente de 1. A primeira componente é a que tem maior valor próprio, seguindo-se a segunda, e assim sucessivamente, sendo o somatório do valor próprio das m-componentes, igual ao número de variáveis utilizadas na análise (Johnson e Wichern, 1998). A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais, bem como as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projecção das amostras no plano principal), permite reconhecer correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com

comportamento semelhante, que seria mais difícil de analisar pela simples observação de números em tabelas. Uma vez que as componentes principais são combinações lineares das variáveis originais, é necessário interpretar esta combinação. Assim, quanto mais elevado for o valor da variável inicial em relação a um CP mais influência tem na sua formação. Deste modo podem usar-se os valores das correlações para determinar quais as variáveis que influenciam cada um dos CPs, atribuindo-lhes um significado. Não existe um valor mínimo estabelecido, a partir do qual podemos afirmar que uma determinada variável influencia a formação do valor de um componente principal; embora haja investigadores que considerem o valor 0,7 (Liu *et al*, 2003), a maior parte consideram tradicionalmente o valor de 0,5 como mínimo (Sharma, 1996).

4.3 – CORRELAÇÃO DE PEARSON

O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1. O valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa, ou seja quando uma das variáveis aumenta a outra diminui. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. É normalmente representado pela letra *r*.

O teste de correlação de Pearson foi elaborado no sentido de entender influência da composição elemental dos solos nos azeites e bagaços de azeitona obtidos.

CAPÍTULO 5 – CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES VIRGENS PROVENIENTES DA CULTIVAR GALEGA VULGAR EM DIFERENTES REGIÕES DO PAÍS (ENSAIO 1)

RESUMO

Na primeira parte do ensaio caracterizaram-se azeites de diferentes cultivares e diferentes regiões do país durante três campanhas consecutivas, em relação ao seu conteúdo em ácidos gordos e posteriormente analisaram-se estatisticamente apenas os azeites virgens provenientes da cultivar Galega vulgar em olivais do Norte, Centro e Sul do país. Na segunda parte restringiu-se a área ao Alentejo e analisaram-se azeites virgens obtidos desta cultivar em dois estados de maturação, extraídos em lagares das margens esquerda e direita do rio Guadiana, essencialmente em relação à composição em ácidos gordos, compostos antioxidantes e pigmentos clorofilinos e carotenoides. Concluiu-se que o azeite da cultivar Galega vulgar se diferenciou do obtido das outras cultivares devido principalmente ao conteúdo elevado em ácido palmitoleico e baixo em ácido linoleico. Em relação às diferentes regiões do país, separaram-se as amostras obtidas no norte pelo seu elevado conteúdo em ácido oleico e as originárias do Baixo Alentejo pelo conteúdo nos ácidos palmítico e palmitoleico. Não foi encontrada relação com o modo de produção. Restringindo a região ao Alentejo e às duas margens do rio Guadiana, foi possível separar as amostras provenientes da margem esquerda do rio, especialmente no estado de maturação verde, pelo seu elevado conteúdo em compostos fenólicos totais, oleuropeína, hidroxitirosol e clorofila. Verificou-se a existência de uma acentuada relação entre a composição mineral dos solos e a dos respectivos azeites virgens.

Palavras-chave: azeite virgem elementar; rastreabilidade geográfica; Galega vulgar; ácidos gordos; antioxidantes.

5.1 – INTRODUÇÃO

A rastreabilidade geográfica dos azeites virgens implica a utilização de métodos analíticos que permitam a identificação da origem do azeite e a autenticação da informação colocada no rótulo (Garcia-González *et al*, 2009).

Não existe um só composto no azeite que esteja diretamente relacionado com a sua origem geográfica mas todos eles são parcialmente afetados pelas características da região de onde provêm. Assim, a análise conjunta dos componentes maiores e menores do azeite é, até agora, a aproximação mais eficiente à determinação da sua origem geográfica. No entanto, só os parâmetros químicos que não se alterem durante o transporte e processamento das azeitonas e armazenamento do azeite extraído podem ser elegíveis como marcadores da rastreabilidade dos azeites até à origem geográfica das oliveiras (Garcia-González *et al*, 2009).

Vários estudos anteriores demonstraram que a composição em ácidos gordos tem um papel fundamental não só na caracterização da cultivar mas também na caracterização pedoclimática dos azeites e, por isso, na sua identificação geográfica (Garcia-González *et al*, 2009; Tsimidou *et al*, 1987; D'imperio *et al*, 2007; Alonso *et al*, 1993).

Ziarati *et al* (2014) afirma que existem muitos factores que afectam as características químicas e físicas dos azeites virgens, como por exemplo o tipo de solo e a temperatura. A temperatura noturna é geralmente mais baixa em altitudes elevadas, afectando a composição em ácidos gordos. Outro dos factores preponderantes na composição do azeite é a estrutura do solo. A matéria orgânica melhora tanto a produtividade da oliveira como a estrutura do solo, ajudando-o a manter os nutrientes em formas disponíveis para as raízes. Assim, num ensaio realizado pelos mesmos autores, estes concluíram que diferentes condições topográficas e ecológicas, especialmente altitude, temperatura e a estrutura do solo resultaram em alterações significativas na composição em ácidos gordos e no conteúdo em minerais e metais pesados nas azeitonas analisadas.

A concentração e composição fenólica dos azeites virgens é fortemente afetada por fatores agronômicos e tecnológicos como a cultivar, o local de origem, o clima, o estado de maturação, a altura da colheita da azeitona e o modo de produção do olival (Baccouri *et al*, 2008; Tura *et al*, 2007; Cerretani *et al*, 2006).

O efeito da maturação no conteúdo em antioxidantes dos azeites virgens depende das interações com o ano da colheita, pelo que é necessário estudar as alterações sazonais em diferentes campanhas (Beltrán *et al*, 2005). A época de colheita é, assim, uma variável crítica, uma vez que a composição química do azeite virgem pode variar consideravelmente de ano para ano (Salvador *et al*, 2003).

Ouni *et al* (2011) refere que as características edafo-climáticas influenciam a produção qualitativa e quantitativa da fração fenólica do azeite, pelo que estes compostos podem ser usados como marcadores para caracterizar e diferenciar os azeites virgens de acordo com a sua origem geográfica. A mesma opinião tem Aparicio *et al* (2002) que afirma que o conteúdo em compostos fenólicos totais de um azeite virgem varia com o tipo de solos do olival de onde provém, sendo este valor consideravelmente mais elevado em solos calcários do que em solos argilosos.

A determinação quantitativa de elementos vestigiais nos alimentos tem sido um desafio para a química analítica, uma vez que estes têm implicações evidentes na nutrição (Bouffleur *et al*, 2013), segurança (Zand *et al*, 2012) e qualidade (Benedet *et al*, 2008) dos produtos. Em relação ao azeite virgem, a análise elemental não tem tido muita atenção, ao contrário de componentes como os ácidos gordos, esteróis e compostos antioxidantes, que têm sido os alvos prioritários na resolução de assuntos relacionados com a sua autenticidade e qualidade. Sabe-se, no entanto, que certos contaminantes metálicos como o cobre (Cu) e o ferro (Fe) aceleram os processos de oxidação do azeite, tendo um efeito negativo na sua qualidade sensorial (Benedet *et al*, 2008). A importância dos metais na estabilidade do azeite virgem explica a existência de limites estabelecidos pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) para o cobre (0,1 mg/Kg) e ferro (3,0 mg/Kg) e também para alguns contaminantes como o chumbo (0,1 mg/Kg) e o arsénio (0,1 mg/Kg), no azeite e no óleo de bagaço de azeitona (COI, 2013). Podem encontrar-se, ainda, outros elementos, transferidos das

superfícies metálicas dos equipamentos de extração e armazenamento ou incorporados no azeite através do solo; neste caso a sua concentração depende das reações bioquímicas de cada cultivar (Chatzistathis *et al*, 2009).

A importância dos elementos minerais que passam para o azeite virgem, através do solo tem, actualmente, especial relevância, uma vez que estes elementos podem ser potencialmente utilizados na rastreabilidade geográfica dos azeites virgens com Denominação de Origem Protegida (DOP) ou Indicação Geográfica Protegida (IGP) (EU, 2012) e na determinação da proveniência geográfica de outros azeites virgens.

Os elementos minerais vestigiais são incorporados na oliveira através do solo e são depois parcialmente transferidos para as azeitonas (Bakircioglu *et al*, 2013). A disponibilidade destes elementos varia de olival para olival, suportando a hipótese de que poderão ser usados para determinar a origem geográfica do azeite virgem.

A cultivar Galega vulgar é a mais difundida em Portugal. Representando cerca de 80% da superfície do olival nacional (CEPAAL, 2013), está disseminada principalmente nas regiões da Beira Interior, Ribatejo, Alentejo e Algarve e entra na constituição das três DOP de azeite virgem do Alentejo.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se fazer a caracterização do azeite virgem proveniente da cultivar Galega vulgar em diferentes regiões de maneira a possibilitar a sua rastreabilidade geográfica. Assim, na primeira parte do ensaio analisou-se a composição média em ácidos gordos de azeites virgem extra obtidos de seis cultivares de azeitona em olivais situados nas regiões Norte, Centro e Sul do país durante três campanhas consecutivas (2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012) e com diferentes modos de produção, a fim de comparar a composição acídica das várias cultivares com a da cultivar Galega vulgar. Na campanha 2011/2012, especificou-se a análise estatística dos resultados para a cultivar Galega vulgar, separando as amostras por concelho e modo de produção: tradicional de sequeiro, tradicional de regadio, intensivo e modo de produção biológico. Na segunda parte do ensaio, com o intuito de aprofundar o tema da rastreabilidade geográfica, tentando verificar a fama que os azeites da margem esquerda do rio Guadiana sempre tiveram ao longo dos séculos (já os romanos elogiavam a sua qualidade) restringiu-se a área em análise ao Alentejo e

procedeu-se à obtenção e análise de amostras de azeite virgem extra extraídas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação e obtidas em seis olivais e lagares situados nas margens esquerda e direita do rio Guadiana. As amostras foram obtidas na mesma campanha (2012/2013) e manteve-se o modo de produção: tradicional de regadio. Analisou-se essencialmente a variação na composição em ácidos gordos e em antioxidantes como compostos fenólicos totais, oleuropeína, hidroxitirosol e tocoferóis α , β e γ . Analisou-se ainda a composição em pigmentos clorofilinos e carotenoides e verificou-se a estabilidade oxidativa das diferentes amostras. Para confirmar a hipótese de que a disponibilidade de elementos minerais existentes no solo varia de olival para olival influenciando o seu conteúdo nas respectivas azeitonas e azeite delas extraído, colheram-se amostras de solos nos seis olivais, analisando-se a sua composição mineral e relacionando-a com a composição mineral dos respectivos azeites virgens e bagaços de azeitona resultantes do processo de extração.

5.2 – MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio iniciou-se na campanha de 2009/ 2010 com a seleção de seis cultivares de azeitona: Arbequina (quatro olivais em modo de produção intensivo), Blanqueta (dois olivais em modo de produção tradicional), Cobrançosa (três olivais em modo de produção intensivo), Cordovil de Serpa (quatro olivais em modo de produção tradicional), Galega vulgar (quinze olivais nos modos de produção intensivo, tradicional e biológico) e picual (três olivais em modo de produção intensivo) em 31 olivais situados nos concelhos de Viseu, Celorico da Beira, Idanha-a-Nova, Fundão, Castelo Branco, Santarém, Avis, Monforte, Alandroal, Vidigueira, Ferreira do Alentejo, Beja, Serpa e Moura. As amostras de azeite virgem foram extraídas pelo método centrífugo de duas fases em lagares situados nos respetivos concelhos e colhidas à saída da centrífuga vertical para frascos de vidro escuro de 500 ml de capacidade, durante o mês de Novembro (em data escolhida pelo olivicultor). As amostras foram congeladas a -20°C até à data da análise. Os azeites virgens foram extraídos em três campanhas consecutivas: 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012, sempre nos mesmos olivais selecionados. Procedeu-se à determinação do conteúdo em ácidos gordos de acordo

com o método descrito no ponto 1.15 no Laboratório de Estudos Técnicos (LET) do Instituto Superior de Agronomia. O fato de, nesta fase, não ter sido possível um controlo total de todos os fatores que influenciam a composição final de um azeite virgem, optou-se por selecionar um parâmetro de análise química que não se alterasse durante a colheita, transporte e armazenamento das azeitonas e que pudesse ser elegível como marcador da rastreabilidade dos azeites até à origem geográfica das oliveiras.

Obtiveram-se assim, para cada cultivar:

- cultivar Arbequina: 12 amostras (4 olivais X 3 campanhas)
- cultivar Blanqueta: 6 amostras (2 olivais X 3 campanhas)
- cultivar Cobrançosa: 9 amostras (3 olivais X 3 campanhas)
- cultivar Cordovil de Serpa: 12 amostras (4 olivais X 3 campanhas)
- cultivar Galega vulgar: 45 amostras (15 amostras X 3 campanhas)
- cultivar picual: 9 amostras (3 amostras X 3 campanhas)

Para a campanha 2011/2012, procedeu-se à avaliação estatística dos resultados, através da análise em componentes principais (ACP) para a cultivar Galega vulgar, separando as amostras por região e modo de produção. As quinze amostras analisadas foram codificadas de acordo com a tabela 7:

Tabela 7 Codificação das amostras de azeite virgem provenientes da cultivar Galega vulgar com base na região de proveniência e modo de produção

AMOSTRA	CONCELHO	FREGUESIA	MODO DE PRODUÇÃO
N v1	Viseu	Sta. Maria	Tradicional sequeiro
N v2	Viseu	Sta. Maria	Intensivo
N v3	Viseu	São José	Biológico
N c4	Celorico da Beira	Carvalheda	Tradicional sequeiro
N c5	Celorico da Beira	Ratoeira	Tradicional regadio
C f1	Fundão	Fundão	Biológico
C f2	Fundão	Castelo Novo	Intensivo
C c3	Castelo Branco	Sarzedas	Tradicional sequeiro
C c4	Castelo Branco	Sarzedas	Tradicional regadio
C i5	Idanha-a-Nova	Provença-a-Velha	Biológico
C s6	Santarém	Santarém	Tradicional sequeiro
S a1	Alandroal	São Pedro	Tradicional sequeiro
S a2	Alandroal	São Pedro	Tradicional regadio
S b3	Beja	Santiago Maior	Biológico
S m4	Moura	S. João Batista	Intensivo

A letra inicial na codificação das amostras pretende separar os azeites em três grandes regiões de proveniência: Norte (N), Centro (C) e Sul (S). A segunda letra, minúscula, identifica o concelho e a terceira letra enumera as amostras por região.

A segunda etapa do trabalho decorreu na campanha de 2012/ 2013 restringindo-se a região em análise ao Alentejo. Colheram-se amostras de azeite virgem extra, obtidos da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação, através do método de extração centrífugo de duas fases com temperatura de extração controlada na bateadeira e na centrífuga vertical entre os 25°C e os 27°C. As amostras foram recolhidas à saída da centrífuga vertical em três lagares localizados em cada uma das margens do rio Guadiana. As amostras de azeite consideradas *azeite verde* foram extraídas no início de Novembro e as de *azeite maduro* extraídas no início do mês de

Dezembro. Em cada lagar recolheram-se três amostras para garrafas de vidro escuro de 500 ml, que foram transportadas para o Laboratório de Vinho e Azeite (LVA) do Instituto Politécnico de Beja e imediatamente congeladas a -20°C até à data das análises. Um dos frascos de cada amostra foi utilizado para a realização das análises efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite do Instituto Politécnico de Beja (LVA): percentagem de acidez, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos a 270 e 232 nm, compostos fenólicos totais, pigmentos clorofilinos e carotenoides e viscosidade e no laboratório do Centro de Biotecnologia do Alentejo (CEBAL): compostos fenólicos individuais por HPLC (oleuropeína, hidroxitirosol e ácido cafeico). O segundo frasco de 500 ml de cada amostra foi transportado congelado para o Laboratório de Estudos Técnicos do Instituto Superior de Agronomia (LET), onde foram realizadas as seguintes análises: ácidos gordos, tocoferóis α , β e γ e estabilidade oxidativa (rancimat), como descrito anteriormente neste trabalho. O terceiro frasco correspondente a cada uma das seis amostras de azeite virgem extraído de azeitonas maduras foi transportado congelado para o laboratório da Universidade de Huelva onde se procedeu à análise elemental. Na mesma altura foram recolhidas, à saída do decanter, 3 amostras de bagaço de azeitona correspondentes a cada uma das amostras de azeite virgem maduro que foram embaladas em frascos de vidro escuro de 500ml e congeladas a -20°C no Instituto Politécnico de Beja até à data das análises. As amostras de solo foram colhidas a 30 cm de profundidade, no início de Dezembro, aquando da colheita das azeitonas maduras. Foram colhidas aleatoriamente 3 amostras em cada um dos 6 olivais correspondentes a cada uma das 6 freguesias analisadas e armazenadas em sacos plásticos com a capacidade de 5 Kg cada. Tanto o terceiro frasco correspondente a cada uma das seis amostras de azeite virgem extraído de azeitonas maduras, como as amostras de bagaço de azeitona e de solo correspondentes foram transportados para o laboratório da Universidade de Huelva onde se procedeu à análise elemental. Para avaliar as diferenças entre a composição elemental do solo, do azeite e do respectivo bagaço de azeitona, analisaram-se 40 elementos vestigiais pelo método ICP-MS (descrito anteriormente), tendo depois sido seleccionados os 12 que apareciam em, pelo menos, dois dos produtos analisados: lítio (Li), boro (B), vanádio (V), crómio (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), gálio (Ga), estrôncio (Sr), cádmio (Cd) e bário (Ba).

Todos os resultados foram analisados estatisticamente através da análise descritiva e análise de variância e técnicas de análise multivariada de dados como a análise em componentes principais (ACP) e classificação aglomerativa hierárquica (Cluster Analysis).

As amostras analisadas nesta segunda parte do ensaio foram as constantes na tabela 8. As amostras de azeite designadas *verde*, provenientes de azeitonas colhidas no início de Novembro, apresentavam um índice de maturação entre 2 e 3 e as amostras classificadas como *maduro*, extraídas de frutos colhidos no início de Dezembro, apresentavam um índice de maturação entre 4 e 5.

Tabela 8 Codificação das amostras de azeite virgem extra extraídas da cultivar Galega vulgar em dois estados de maturação em lagares das margens esquerda e direita do rio Guadiana

Amostra	Maturação	Margem do rio	Concelho	Freguesia
EVC	Verde	Esquerda	Moura	Sto. Agostinho
EMC	Maduro	Esquerda	Moura	Sto. Agostinho
EVM	Verde	Esquerda	Moura	S. João Batista
EMM	Maduro	Esquerda	Moura	S. João Batista
EVE	Verde	Esquerda	Serpa	Salvador
EME	Maduro	Esquerda	Serpa	Salvador
DVB	Verde	Direita	Beja	Santiago Maior
DMB	Maduro	Direita	Beja	Santiago Maior
DVF	Verde	Direita	Beja	S. Brissos
DMF	Maduro	Direita	Beja	S. Brissos
DVR	Verde	Direita	Reguengos de Monsaraz	Reg. de Monsaraz
DMR	Maduro	Direita	Reguengos de Monsaraz	Reg. de Monsaraz

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo faz-se, inicialmente, uma apreciação dos resultados das análises obtidas na primeira parte do ensaio em que se pretendeu comparar a composição acídica de várias cultivares de azeitona com a da cultivar Galega vulgar e fazer a rastreabilidade geográfica das amostras de azeite extraídas da cultivar Galega vulgar nas regiões Norte, Centro e Sul do país com base na sua composição em ácidos gordos. De

seguida, faz-se a caracterização química de amostras de azeite virgem extra extraídas da cultivar Galega vulgar nos estados de maturação verde e maduro em lagares situados nas margens esquerda e direita do rio Guadiana, analisando-se as diferenças na composição em relação à maturação e ao local de proveniência das amostras. Finalmente compara-se a composição elemental dos solos e dos azeites e bagaços de azeitona obtidos das azeitonas maduras afim de verificar a possível existência de uma relação padrão que possa contribuir para a rastreabilidade geográfica dos azeites virgens.

Os resultados das médias das três repetições de cada análise efectuada são apresentados sob a forma de figuras e/ ou tabelas.

Uma vez que cada amostra de azeite foi caracterizada por vários parâmetros de qualidade e de composição, o estudo de um parâmetro isoladamente não permite avaliar as modificações ocorridas simultaneamente em todas as variáveis analisadas para os dois estados de maturação e diferentes locais de origem dos azeites. Assim, após a análise estatística descritiva através da determinação da média, desvio e erro padrão, bem como do intervalo de confiança da média a 95% e a análise de variância a um fator (teste de Scheffé para a comparação de médias), apresentam-se os resultados graficamente através do método “box and whiskers” que permite colocar em evidência os dois fatores em estudo (maturação dos frutos e margem do rio) para cada análise, demonstrando de forma sucinta as diferenças verificadas nas tabelas. Procedeu-se à análise multivariada dos dados pela Análise em Componentes Principais (ACP) e ainda à aplicação do teste de correlação de Pearson na avaliação da relação da composição elemental dos solos com os azeites e bagaços de azeitona obtidos.

Os valores médios foram obtidos a partir de três amostras semelhantes e três réplicas laboratoriais de cada amostra, pelo que o valor médio de cada determinação está associado a nove repetições ($n = 9$).

5.3.1 – Composição acídica de azeites virgens extraídos das cultivares Arbequina, Blanqueta, Cobrançosa, Cordovil de Serpa, Galega vulgar e picual

A composição qualitativa em ácidos gordos é constante nos diferentes azeites virgens, variando quantitativamente a percentagem entre eles devido a diversos fatores como a cultivar, região, condições climáticas, quantidade de água disponível durante o crescimento da azeitona, altitude e estado de maturação dos frutos (Aguilera *et al*, 2005; Aparicio *et al*, 2002; Gouveia, 1995).

Considerando, no entanto, que a composição em ácidos gordos tem um papel fundamental na caracterização das cultivares de azeitona, apresentam-se, na tabela 9 os resultados (média e desvio padrão) obtidos na determinação da composição em ácidos gordos para os azeites virgens obtidos das várias cultivares em estudo, durante as três campanhas nas regiões Norte, Centro e Sul do país. Para diluir a influencia de todos os fatores que podem contribuir para a variabilidade na composição em ácidos gordos, fazendo sobressair apenas as diferenças em relação à cultivar, os resultados apresentados referem-se à média da determinação para todas as amostras analisadas, independentemente do estado de maturação do fruto, do local de proveniência, das características edafoclimáticas, do modo de produção do olival e do ano de colheita.

Tabela 9 Composição percentual (média e desvio padrão) em ácidos gordos das cultivares picual, Galega, Cordovil, Blanqueta, Arbequina e Cobrançosa em várias regiões do país durante três campanhas

Cultivar	Picual n=9	Galega n=45	Cordovil n=12	Blanqueta n=6	Arbequina n=12	Cobrançosa n=9
AG						
C16:0	11,33(1,07)	14,27(1,05)	11,18(0,72)	15,16 (1,82)	14,32(0,39)	12,16(0,96)
C16:1	0,94(0,08)	2,19(0,34)	0,92(0,17)	1,34(0,15)	1,67(0,13)	0,88(0,27)
C17:0	0,05(0,01)	0,13(0,03)	0,05(0,03)	0,18(0,05)	0,11(0,01)	0,16(0,04)
C17:1	0,08(0,02)	0,34(0,03)	0,09(0,07)	0,33(0,04)	0,23(0,01)	0,23(0,02)
C18:0	2,99(0,51)	1,82(0,20)	2,24(0,24)	2,10(0,64)	1,77(0,11)	4,35(0,61)
C18:1	79,43(0,75)	75,08(1,20)	78,85(0,92)	64,35(5,11)	70,40(1,58)	71,87(2,86)
C18:2	3,15(0,25)	4,07(0,53)	4,79(1,37)	14,94(2,86)	9,69(1,24)	8,05(2,14)
C18:3	0,70(0,07)	0,66(0,06)	0,77(0,01)	1,07(0,35)	0,55(0,10)	0,77(0,04)
C20:0	0,38(0,01)	0,32(0,02)	0,36(0,04)	0,39(0,01)	0,37(0,02)	0,46(0,02)
C20:1	0,25(0,01)	0,25(0,03)	0,29(0,04)	0,36(0,12)	0,30(0,01)	0,20(0,01)
C22:0	0,11(0,01)	0,09(0,01)	0,11(0,02)	0,12(0,02)	0,11(0,01)	0,10(0,01)
C24:0	0,05(0,01)	0,04(0,01)	0,05(0,02)	0,04(0,00)	0,04(0,01)	0,06(0,01)
AGS	14,92(0,57)	16,69(1,01)	14,00(0,72)	17,98(1,17)	16,72(0,40)	17,23(0,66)
AGMI	80,69(0,68)	77,87(0,99)	80,15(0,90)	66,37(4,89)	72,61(1,46)	73,18(2,73)
AGPI	3,87(0,24)	4,74(0,57)	5,56(1,38)	16,01(3,22)	10,24(1,33)	8,81(2,11)
AGMI/AGPI	20,83(1,43)	16,42(2,15)	14,42(3,94)	4,15(1,16)	7,09(1,00)	8,30(1,33)

AGS: Ácidos Gordos Saturados; AGMI: Ácidos Gordos Monoinsaturados; AGPI: Ácidos gordos Polinsaturados

Como se pode verificar na tabela 9 a composição em ácidos gordos nos azeites estudados é variável dependendo do genótipo da cultivar. Os ácidos gordos monoinsaturados, em maior percentagem, têm grande importância devido às suas implicações nutricionais e efeito na estabilidade oxidativa dos azeites (Zarrouk *et al*, 2009). O ácido oleico (C18:1) é o principal ácido gordo monoinsaturado (55% - 83%) e, nas amostras analisadas das diferentes cultivares, está presente num intervalo que varia entre 64,35% na cultivar Blanqueta e 79,43% na cultivar Picual. Estes valores estão de acordo com os autores consultados (tabela 2.5) e Zarrouk *et al* (2009) que obteve, nas 19 cultivares analisadas, para este ácido, um intervalo de variação considerável, entre 42,23% e 77,5%. De realçar o facto de, neste ensaio, as cultivares Picual e Cordovil apresentarem um teor em ácido oleico bastante elevado, superior ao resultado encontrado por Zarrouk *et al* (2009) nas amostras de azeite das 19 cultivares analisadas. O conteúdo em ácido palmitoleico (C16:1), o segundo ácido gordo monoinsaturado mais relevante no azeite variou entre 0,92% na cultivar Cordovil e 1,67% na cultivar Arbequina. O teor de ácido palmítico (C16:0), o mais importante ácido gordo saturado existente no azeite, variou entre 11,33% na cultivar Picual e 15,15% na cultivar Blanqueta, podendo ser considerado um valor mediano quando comparado com os autores consultados, expostos na tabela 2.5. A percentagem de ácido esteárico (C18:0), outro ácido gordo saturado importante, variou entre 1,77% na cultivar Arbequina e 4,35% na cultivar Cobrançosa. Em relação aos ácidos gordos polinsaturados, importantes na nutrição mas negativamente relacionados com a estabilidade do azeite por serem muito mais susceptíveis à oxidação do que os ácidos gordos monoinsaturados, obteve-se a menor percentagem de ácido linoleico (C18:2) na cultivar Picual (3,15%) e a maior percentagem na cultivar Blanqueta (14,94%). De realçar o facto de o Conselho Oleícola Internacional (COI) e o Regulamento (EU) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro estabelecerem como limites para este ácido gordo os valores de 3,5% (mínimo) e 21,0% (máximo). Verifica-se assim que, com a excepção da cultivar Blanqueta, todas as cultivares analisadas apresentaram um conteúdo relativamente baixo de ácido linoleico, tendo mesmo a cultivar Picual apresentado um valor inferior ao valor mínimo estabelecido. Em relação ao ácido linolénico (C18:3), o ácido gordo mais insaturado presente no azeite, o valor variou entre 0,55% para a cultivar Arbequina e 1,07% para a cultivar Blanqueta, percentagem

que ultrapassa ligeiramente o máximo de 1,0%, estabelecido para o azeite virgem extra no Regulamento (EU) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro. De acordo com outros autores consultados o valor máximo de 1% foi ultrapassado em azeites marroquinos analisados por El Antari *et al* (2003) que obteve resultados de 1,43%; Ravetti (1999) e Rondanini *et al* (2011) analisaram azeites argentinos com percentagens de 1,42% e 1,30%, respectivamente, de ácido linolénico. Meehan (2001) encontrou azeites com 1,5% de C18:3 na Nova Zelândia e, mesmo na Europa, Dettori e Russo (1993) reportaram valores entre 1,10% e 1,40% em azeites provenientes da província de Lecce em Itália. Em ensaios realizados por Rondanini *et al* (2011) e por Esmaili *et al* (2012), os autores observaram uma relação inversa entre o conteúdo de ácido oleico e dos ácidos linoleico e palmítico. Assim, no ensaio de Rondanini *et al* (2011), enquanto cultivares com um baixo conteúdo em ácido oleico como a Arbequina e a Arauco apresentaram teores elevados de ácido linoleico e palmítico, cultivares com um elevado conteúdo em ácido oleico como as cultivares Picual, Changlot e Coratina apresentaram teores inferiores dos ácidos linoleico e palmítico. No presente ensaio o mesmo foi observado para todas as cultivares analisadas: a cultivar Picual, com o valor mais elevado de ácido oleico (79,43%), apresentou o conteúdo mais baixo em ácido linoleico (3,15%) e palmítico (11,33%) e a cultivar Blanqueta, com o teor mais baixo de ácido oleico (64,35%), os valores superiores de ácido linoleico (14,94%) e palmítico (15,16%). A razão entre os ácidos gordos insaturados, ou seja, a razão ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) do azeite virgem contribui para a caracterização das cultivares, uma vez que o perfil de ácidos gordos é afectado principalmente pela cultivar. Assim, no presente ensaio, a relação AGMI/AGPI variou entre 4,15 para a cultivar Blanqueta e 20,83 para a cultivar Picual, tendo Zarrouk *et al* (2009) obtido valores compreendidos entre 1,73 e 17,52 nas 19 cultivares analisadas. Em relação à cultivar Galega vulgar esta distinguiu-se das outras cultivares, principalmente devido ao seu elevado conteúdo em ácido palmitoleico (2,19%). Apresentou também um conteúdo baixo em ácidos gordos polinsaturados, ácido linoleico (4,07%) e linolénico (0,66%) e, se excluirmos a cultivar Blanqueta devido à sua pouca representatividade no país, pode-se concluir que a cultivar Galega vulgar apresentou também um dos conteúdos mais elevados em ácido palmítico (14,27%). Em relação à composição em ácido oleico nas amostras em estudo,

apresentou uma composição média (75,08%). A razão AGMI/AGPI foi consideravelmente elevada, de 16,42, a segunda maior a seguir à cultivar Picual e a mais elevada entre as cultivares portuguesas.

5.3.2 – Composição acídica de azeites virgens extraídos da cultivar Galega vulgar provenientes de olivais do Norte, Centro e Sul do país

De acordo com a bibliografia consultada no capítulo das considerações teóricas, Curci (2001), refere que os ácidos gordos que constituem o azeite apresentam uma certa variabilidade, de acordo com a região de proveniência, havendo, no entanto, uma clara prevalência do ácido oleico. Também Gurdeniz *et al* (2008) afirma que a descrição de uma cultivar específica com base no seu perfil em ácidos gordos é importante, uma vez que este parâmetro é um dos parâmetros de qualidade de um azeite virgem e tem um poder discriminante positivo permitindo distinguir azeites virgens elementares, mesmo quando originários de áreas geográficas muito próximas.

Assim, após análise da composição em ácidos gordos das amostras de azeite virgem, para avaliar a influência da região de proveniência no perfil em ácidos gordos da cultivar Galega vulgar, procedeu-se à análise estatística, através do método de análise em componentes principais (ACP), dos azeites obtidos desta cultivar, de acordo com o concelho e freguesia de origem, separando-as em amostras obtidas no Norte, Centro e Sul do país (ver codificação das amostras no ponto 5.2, tabela 7). As amostras foram também descritas de acordo com o modo de produção do respetivo olival.

Tabela 10 Composição percentual (média e desvio padrão) em ácidos gordos das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar nas regiões Norte (N), Centro (C) e Sul (S)

A	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1/ C18:2
Nv1	13,77 (0,08)	2,15 (0,05)	0,12 (0,01)	0,34 (0,01)	1,65 (0,02)	76,39 (0,22)	3,40 (0,09)	0,61 (0,01)	22,47
Nv2	14,01 (0,10)	2,30 (0,02)	0,12 (0,01)	0,34 (0,01)	1,63 (0,01)	76,18 (0,15)	3,49 (0,08)	0,66 (0,02)	21,83
Nv3	13,53 (0,05)	2,14 (0,03)	0,13 (0,02)	0,31 (0,01)	1,62 (0,03)	76,23 (0,19)	3,41 (0,10)	0,58 (0,02)	22,35
Nc4	12,95 (0,12)	1,57 (0,02)	0,11 (0,01)	0,34 (0,01)	1,97 (0,01)	76,16 (0,31)	4,58 (0,06)	0,71 (0,01)	16,62
Nc5	12,80 (0,11)	1,87 (0,02)	0,11 (0,01)	0,33 (0,01)	1,87 (0,02)	75,99 (0,23)	4,39 (0,11)	0,77 (0,01)	17,31
Cf1	13,00 (0,09)	1,82 (0,01)	0,11 (0,01)	0,32 (0,01)	2,02 (0,02)	76,84 (0,13)	3,93 (0,07)	0,60 (0,02)	19,55
Cf2	14,19 (0,05)	2,27 (0,03)	0,11 (0,02)	0,32 (0,01)	1,72 (0,04)	74,74 (0,33)	4,35 (0,09)	0,68 (0,01)	17,18
Cc3	14,97 (0,07)	2,14 (0,04)	0,12 (0,01)	0,35 (0,01)	1,90 (0,04)	74,90 (0,13)	4,43 (0,13)	0,64 (0,01)	16,91
Cc4	15,55 (0,06)	2,53 (0,01)	0,12 (0,01)	0,30 (0,01)	1,72 (0,03)	74,36 (0,22)	3,36 (0,14)	0,58 (0,01)	22,13
Ci5	14,64 (0,14)	2,40 (0,01)	0,14 (0,01)	0,36 (0,01)	1,83 (0,02)	74,01 (0,18)	4,62 (0,08)	0,68 (0,01)	16,02
Cs6	15,78 (0,18)	2,20 (0,02)	0,13 (0,01)	0,35 (0,01)	1,78 (0,02)	74,08 (0,15)	3,74 (0,07)	0,69 (0,02)	19,81
Sa1	14,16 (0,11)	2,28 (0,02)	0,20 (0,01)	0,44 (0,01)	2,30 (0,01)	73,54 (0,25)	5,05 (0,05)	0,68 (0,02)	14,56
Sa2	14,64 (0,15)	2,07 (0,02)	0,17 (0,01)	0,33 (0,01)	1,80 (0,02)	74,63 (0,19)	4,21 (0,10)	0,69 (0,01)	17,73
Sb3	15,75 (0,09)	2,95 (0,03)	0,12 (0,01)	0,31 (0,01)	1,61 (0,02)	73,10 (0,18)	4,06 (0,12)	0,65 (0,01)	18,00
Sm4	15,69 (0,10)	2,33 (0,05)	0,12 (0,01)	0,30 (0,01)	1,73 (0,01)	74,30 (0,16)	4,21 (0,09)	0,66 (0,02)	17,65

De acordo com Zarrouk *et al* (2009), o conteúdo em ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e a razão entre ambos são valores relevantes para discriminar amostras de azeite virgem e depende principalmente da cultivar (Rondanini *et al*, 2011). Assim, de acordo com a tabela 10, independentemente da região de origem, observa-se que as características varietais da cultivar Galega vulgar se mantiveram: um elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados: ácido palmitoleico (C16:1) e ácido oleico (C18:1), um baixo teor em ácidos gordos polinsaturados: ácido linoleico (C18:2) e ácido linolénico (C18:3) e um elevado teor em ácidos gordos saturados, principalmente ácido palmítico (C16:0), o que confere aos azeites extraídos desta

cultivar uma elevada relação ácido oleico/ácido linoleico, contribuindo para uma considerável resistência à oxidação, apesar do seu baixo teor em compostos fenólicos, como se verá mais à frente nos resultados deste ensaio. No entanto, e ainda de acordo com a tabela 10, verifica-se também uma tendência para um aumento do teor de ácido oleico com a latitude, ou seja, as amostras de azeite virgem com um conteúdo em ácido oleico mais elevado foram as obtidas no Norte do país, oriundas dos concelhos de Viseu e Celorico da Beira (entre 75,99% e 76,39%) e as amostras de azeite virgem com o teor mais baixo de ácido oleico foram as extraídas no Alentejo (entre 73,10% e 74,63%). Em relação ao teor de ácido linoleico, as diferenças entre regiões foram menores, apesar de as amostras de azeite virgem obtidas no concelho de Viseu (Norte) terem sido as que obtiveram o valor mais baixo em ácido linoleico (entre 3,40% e 3,49%) para os anos em análise. Este valor foi mesmo ligeiramente inferior ao mínimo estipulado pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) e pelo Regulamento (EU) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro (3,5%). A razão ácido oleico/ ácido linoleico (C18:1/C18:2) foi, em média, superior nas amostras obtidas no concelho de Viseu (entre 21,83 e 22,47), não havendo uma variação relevante nos restantes concelhos do país. Estes resultados estão de acordo com Rondanini *et al* (2011) que sugere que diferenças no teor de ácido oleico na mesma cultivar com origem em diferentes regiões será o resultado de uma interação genótipo X ambiente, que não é igual para todas as cultivares. Em um ensaio realizado pelo autor este verificou que o conteúdo de ácido oleico na cultivar Arbequina estava significativamente associado com a temperatura média durante a fase de acumulação de azeite, tendo a relação sido negativa: o teor de ácido oleico desceu dois pontos percentuais por °C de temperatura média entre os 23°C e os 27°C. No mesmo sentido Turhan *et al* (2010) refere que o aumento da temperatura resulta num aumento do conteúdo em ácido linoleico devido ao efeito da temperatura na actividade das enzimas dessaturase que convertem o ácido oleico em ácido linoleico. Estes resultados não são no entanto consensuais entre autores uma vez que Esmaili *et al* (2012) e Tura *et al* (2007) obtiveram, para outras cultivares, resultados contrários, ou seja, um teor de ácido oleico mais elevado em regiões mais quentes, o que poderá estar relacionado com diferenças no metabolismo dos lípidos para as diferentes cultivares e também com outras variáveis ambientais como amplitudes térmicas, temperatura noturna e

quantidade de água disponível, por exemplo . No presente ensaio, para a cultivar Galega vulgar, obteve-se uma tendência semelhante aos resultados de Rondanini *et al* (2011) e de Turhan *et al* (2010), ou seja, um teor de ácido oleico superior no Norte e inferior no Sul, sugerindo uma diminuição do seu conteúdo com o aumento da temperatura ambiente. Em relação aos ácidos gordos saturados (ácido palmítico), todos os autores consultados no capítulo 2 deste trabalho e ainda Esmaeili *et al* (2012) e Beltrán *et al* (2004) referem o efeito da temperatura no teor de ácido palmítico, concluindo que valores de temperatura mais baixos reduziram o teor de ácido palmítico (C16:0) nas amostras de azeite virgem, o que está de acordo com os resultados obtidos neste ensaio tendo, no geral, as amostras oriundas do Norte o teor mais baixo de ácido palmítico (12,80% e 12,95% no concelho de Celorico da Beira) e as amostras extraídas no Sul o conteúdo mais elevado (15,69% e 15,75%, ambas no distrito de Beja, respectivamente nos concelhos de Moura e Beja).

Para avaliar o possível agrupamento das amostras de azeite por regiões aplicou-se a análise em componentes principais, tendo sido considerados os oito principais ácidos gordos, ou seja, oito atributos, por serem os que possuem maior poder discriminante nos azeites virgens: ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico, (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:0), ácido heptadecenóico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolénico (C18:3). Na tabela 11 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 11 Valores próprios e extração dos componentes principais

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio acumulado	Variância Acumulada (%)
1	3,30	41,32	3,30	41,32
2	2,74	34,23	6,04	75,55
3	0,93	11,68	6,98	87,23
4	0,44	5,51	7,42	92,74
5	0,25	3,14	7,67	95,88
6	0,21	2,68	7,88	98,56
7	0,09	1,11	7,97	99,67
8	0,03	0,32	8,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 75,55% da variância: 41,32% para o primeiro componente e 34,23% para o segundo. Estando em análise oito atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes oito atributos são transformados em oito componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 3,30 e o segundo de 2,74. Todos os outros componentes tiveram valor próprio inferior a 1.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 12).

Tabela 12 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
C16:0 (%)	-0,11	-0,93*
C16:1 (%)	-0,22	-0,93*
C17:0 (%)	-0,80*	-0,24
C17:1 (%)	-0,83*	0,11
C18:0 (%)	-0,76*	0,46
C18:1 (%)	0,57	0,79*
C18:2 (%)	-0,84*	0,21
C18:3 (%)	-0,59	0,24

*correlações significativas ($r > 0,7$), segundo Liu *et al*, 2003.

Os resultados da análise mostraram que o primeiro componente principal, CP1, é explicado pelos ácidos gordos C17:0, C17:1, C18:0 e C18:2, com valor de correlação negativo. O segundo componente principal, CP2, é explicado pelos C16:0 e C16:1, com valor de correlação negativo, e pelo C18:1, com valor de correlação positivo. Assim, na figura 6 pode observar-se a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

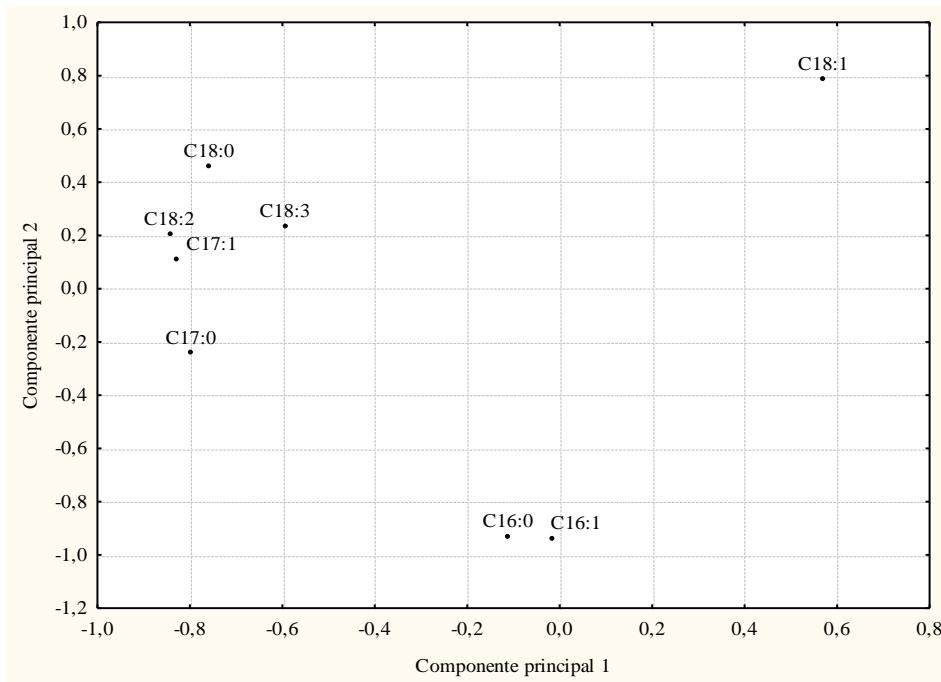


Figura 6 Distribuição dos atributos no plano

E na figura 7 pode observar-se a projeção das amostras de azeite extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de olivais situados no Norte, Centro e Sul do país, no plano principal.

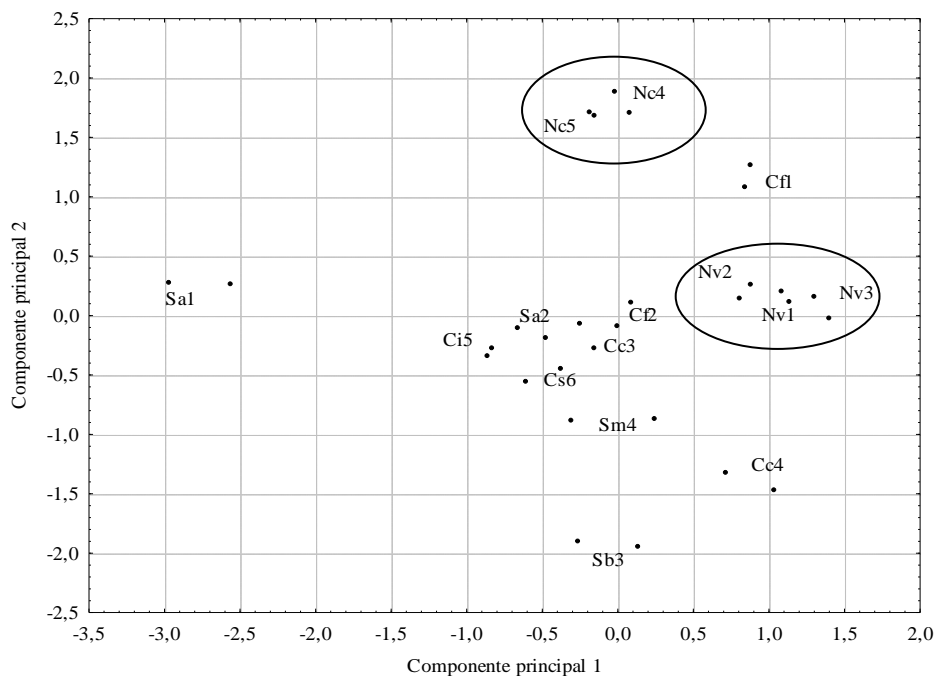


Figura 7 Projeção das amostras de azeite virgem provenientes das diferentes regiões do país no plano principal

De acordo com as figuras 6 e 7, verifica-se que há uma separação de amostras por grupos e que os grupos se separam por regiões e não por modos de produção. Assim, as amostras Nc4 e Nc5, ambas oriundas do concelho Celorico da Beira mas com diferentes modos de produção (tradicional de sequeiro e tradicional de regadio), separam-se pelo seu conteúdo em ácido oleico. O mesmo acontece com as amostras provenientes do concelho de Viseu (Nv1, Nv2, Nv3), com os modos de produção: tradicional de sequeiro, intensivo e biológico, respetivamente. Pode, assim, afirmar-se que, para os azeites extraídos da cultivar Galega vulgar e excluindo a amostra Cf1, proveniente do Fundão, as amostras analisadas provenientes do Norte do país, se separam das provenientes do Centro e Sul, devido ao seu mais elevado conteúdo em ácido oleico. A maior parte das amostras provenientes do Centro do país formam um grupo que se posiciona no centro do plano principal, evidenciando uma composição semelhante nos ácidos gordos analisados. Para o Sul do país não se encontrou um padrão no conteúdo em ácidos gordos, o que se deve, provavelmente, ao facto de, nas amostras provenientes do Sul do país estarem incluídos azeites extraídos no Alto Alentejo e no Baixo Alentejo (regiões geograficamente distantes e com características edafo-climáticas muito diferentes). Assim, se considerarmos apenas as amostras obtidas no Baixo Alentejo, Sb3 (proveniente do concelho de Beja – modo de produção biológico) e Sm4 (proveniente do concelho de Moura – modo de produção intensivo), verifica-se que apresentam um conteúdo mais elevado nos ácidos gordos palmítico e palmitoleico do que as restantes amostras, confirmando-se o poder discriminante da região.

Finalmente, não se verificou nenhuma relação entre o perfil ácido das amostras (para os oito ácidos gordos analisados) e o modo de produção das azeitonas, possivelmente por o peso das características edafo-climáticas se sobrepor ao modo de produção.

5.3.3 – Caracterização química de azeites virgens extraídos da cultivar Galega Vulgar nos estados de maturação verde e maduro provenientes das margens esquerda e direita do rio Guadiana

Conhecendo o poder discriminante do perfil de ácidos gordos para diferenciar azeites virgens provenientes de diferentes regiões no mesmo país, o passo seguinte foi tentar caracterizar amostras da mesma cultivar restringindo a área em estudo. Uma vez que a área selecionada é restrita, as amostras recolhidas provêm de zonas geograficamente muito próximas, com características edafo-climáticas muito semelhantes, o que aumenta a dificuldade em as diferenciar. Assim, com o objetivo de alcançar uma diferenciação satisfatória, foi considerado o estado de maturação das azeitonas, extraíndo-se o azeite em dois estados de maturação diferentes e, em relação às análises efectuadas foi considerada não só a composição em ácidos gordos, mas também outras variáveis importantes na caracterização de azeites virgens como o conteúdo em compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, oleuropeína, ácido cafeico, tocoferóis α , β e γ e ainda viscosidade, pigmentos clorofilinos e carotenoides e estabilidade oxidativa.

Nas tabelas 13, 14 e 15 apresentam-se os valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para todas as determinações efetuadas às amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar, codificadas e caracterizadas no ponto 5.2. Cada valor médio está associado a nove repetições pois foram obtidos a partir de três amostras semelhantes e de três réplicas laboratoriais de cada amostra ($n = 9$).

Tabela 13 Caracterização química: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas

	EVM	EMM	EVE	EME	EVC	EMC	DVF	DMF	DVR	DMR	DVB	DMB
Acidez (%)	0,20 ^g (0,02)	0,53 ^b (0,03)	0,44 ^{cd} (0,01)	0,31 ^f (0,02)	0,18 ^g (0,01)	0,27 ^f (0,02)	0,48 ^{bc} (0,02)	0,69 ^a (0,04)	0,41 ^{de} (0,02)	0,37 ^e (0,04)	0,43 ^{cd} (0,01)	0,68 ^a (0,04)
IP	6,5 ^{bc} (0,2)	6,5 ^{bc} (0,7)	6,2 ^{bc} (0,3)	7,4 ^b (0,8)	4,2 ^e (0,2)	5,8 ^{cd} (1,1)	5,6 ^{cd} (0,3)	5,8 ^{cd} (0,3)	6,1 ^c (0,3)	4,6 ^{de} (0,5)	6,2 ^{bc} (0,6)	9,8 ^a (0,8)
k270	0,09 ^e (0,002)	0,126 ^{ab} (0,004)	0,113 ^{cd} (0,004)	0,129 ^a (0,006)	0,112 ^{cd} (0,006)	0,121 ^{abc} (0,002)	0,115 ^{cd} (0,006)	0,125 ^{ab} (0,003)	0,107 ^d (0,003)	0,117 ^{bc} (0,002)	0,124 ^{ab} (0,004)	0,125 ^{ab} (0,005)
k232	1,650 ^{cd} (0,010)	1,567 ^{fg} (0,045)	1,632 ^{de} (0,015)	1,740 ^a (0,052)	1,662 ^{bcd} (0,012)	1,723 ^a (0,016)	1,531 ^g (0,024)	1,586 ^{efg} (0,037)	1,557 ^{fg} (0,008)	1,591 ^{ef} (0,023)	1,703 ^{abc} (0,016)	1,718 ^{ab} (0,018)
Viscosidade	0,080 (0,002)	0,079 (0,004)	0,082 (0,003)	0,081 (0,004)	0,076 (0,007)	0,080 (0,003)	0,075 (0,006)	0,081 (0,002)	0,075 (0,005)	0,076 (0,006)	0,080 (0,001)	0,082 (0,001)
Clorofila (mg/Kg)	15,67 ^{bc} (0,03)	13,16 ^{gh} (0,13)	16,52 ^b (0,23)	14,03 ^{fg} (0,18)	17,99 ^a (0,04)	14,12 ^{ef} (0,18)	15,27 ^{cd} (0,32)	10,46 ⁱ (0,64)	14,94 ^{cde} (0,36)	10,58 ⁱ (0,12)	14,74 ^{def} (0,59)	12,40 ^h (0,91)
Carotenoides (mg/Kg)	5,44 ^g (0,03)	5,52 ^g (0,03)	6,71 ^c (0,04)	7,13 ^b (0,14)	6,38 ^{de} (0,03)	7,47 ^a (0,07)	4,37 ⁱ (0,03)	6,62 ^{cd} (0,18)	4,73 ^h (0,29)	6,15 ^{ef} (0,06)	6,04 ^f (0,13)	6,15 ^{ef} (0,13)

^{a,b,c...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=9 (teste de Scheffe)

Codificação das amostras: as letras iniciais E e M indicam a margem do rio onde se obtiveram as amostras (Esquerda e Direita); a segunda letra V ou M refere-se à maturação das azeitonas (Verde e Madura) e a terceira letra ao lugar onde se extraiu o azeite.

IP – Índice de Peróxidos; k270 e k232: Índices espectrofotométricos, medidos na região do ultra-violeta a 270 e 232 nm.

Tabela 14 Caracterização química (continuação): valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras analisadas

	EVM	EMIM	EVE	EME	EVC	EMC	DVF	DMF	DVR	DMR	DVB	DMB
Comp.fenol.T (mg/kg)	141,8 ^c (8,0)	136,5 ^{cd} (7,5)	219,6 ^a (2,1)	110,1 ^{fg} (3,8)	184,3 ^b (3,6)	118,8 ^{ef} (3,9)	104,4 ^{gh} (2,7)	97,5 ^{hi} (3,4)	128,2 ^{de} (4,6)	77,6 ⁱ (6,7)	90,5 ^j (3,8)	72,7 ^k (4,0)
Hidroxitirosol (mg/kg)	11,73 ^b (1,83)	7,41 ^c (0,67)	26,15 ^a (5,20)	6,06 ^{cd} (0,66)	2,94 ^{de} (1,14)	2,65 ^{de} (0,36)	5,16 ^{cd} (0,33)	3,91 ^{cde} (0,23)	1,38 ^e (0,12)	1,08 ^e (0,07)	5,19 ^{cd} (1,18)	4,16 ^{cde} (0,71)
Ac cafeico (mg/kg)	0,88 ^{bc} (0,04)	0,78 ^{bc} (0,02)	0,00 ^e (0,00)	0,00 ^e (0,00)	1,20 ^a (0,06)	0,33 ^d (0,45)	0,89 ^{abc} (0,03)	0,82 ^{bc} (0,02)	1,09 ^{ab} (0,20)	0,77 ^c (0,03)	0,80 ^{bc} (0,06)	0,91 ^{abc} (0,03)
Oleuropeina (mg/kg)	28,51 ^{cd} (5,83)	6,92 ^f (1,46)	33,98 ^c (7,84)	29,30 ^{cd} (1,37)	87,90 ^a (1,90)	43,57 ^b (1,10)	32,44 ^c (1,59)	24,39 ^{de} (1,87)	24,18 ^{de} (2,31)	19,95 ^e (2,51)	29,90 ^{cd} (4,97)	11,53 ^f (3,45)
Tocopherol α (mg/kg)	247,91 ^e (6,70)	266,60 ^d (4,66)	290,12 ^c (1,83)	307,34 ^a (2,77)	237,13 ^f (2,19)	242,64 ^{ef} (1,33)	267,03 ^d (3,44)	263,68 ^d (2,32)	209,62 ^h (3,21)	228,29 ^g (1,02)	298,63 ^b (2,97)	263,93 ^d (1,98)
Tocopherol β (mg/kg)	1,56 ^e (0,05)	1,76 ^d (0,04)	1,35 ^f (0,04)	2,13 ^{ab} (0,06)	1,54 ^e (0,05)	1,69 ^d (0,06)	2,08 ^{ab} (0,03)	2,17 ^a (0,04)	1,58 ^e (0,05)	1,48 ^e (0,02)	1,88 ^c (0,05)	2,07 ^b (0,02)
Tocopherol γ (mg/kg)	11,30 ^{bc} (0,37)	10,28 ^{ef} (0,27)	11,80 ^{abc} (0,25)	11,82 ^{abc} (0,20)	12,54 ^a (0,44)	10,93 ^{de} (0,44)	9,08 ^g (0,32)	12,05 ^{ab} (0,07)	10,01 ^f (0,23)	12,48 ^a (0,55)	11,89 ^{ab} (0,57)	11,02 ^{cde} (0,47)
Rancimat (horas)	19,9 ^c (1,3)	24,0 ^b (1,4)	17,7 ^d (0,6)	26,5 ^a (0,9)	27,6 ^a (1,1)	18,1 ^{cd} (0,8)	19,0 ^{cd} (0,4)	19,5 ^{cd} (0,6)	10,7 ^f (0,8)	12,4 ^f (0,6)	18,2 ^{cd} (0,7)	14,6 ^e (0,3)

a,b,c... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=9 (teste de Scheffé)

Codificação das amostras: as letras iniciais E e M indicam a margem do rio onde se obtiveram as amostras (Esquerda e Direita); a segunda letra V ou M refere-se à maturação das azeitonas (Verde e Madura) e a terceira letra ao lagar onde se extraiu o azeite.

Tabela 15 Caracterização ácida percentual: valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as diferentes amostras

	EVM	EMM	EVE	EME	EVC	EMC	DVF	DMF	DVR	DMR	DVB	DMB
Mon/Pol	11,98 ^e (0,36)	16,03 ^a (0,28)	13,41 ^d (0,12)	13,81 ^{cd} (0,16)	13,84 ^{cd} (0,26)	14,47 ^b (0,56)	15,55 ^a (0,14)	14,24 ^{bc} (0,09)	9,31 ^f (0,06)	9,56 ^f (0,15)	13,88 ^{cd} (0,19)	13,36 ^d (0,10)
C16:0	16,11 ^{ab} (0,04)	15,87 ^b (0,17)	15,24 ^c (0,12)	14,73 ^{de} (0,07)	16,48 ^a (0,07)	15,80 ^b (0,41)	15,35 ^c (0,18)	14,46 ^{ef} (0,15)	14,40 ^{ef} (0,19)	12,69 ^g (0,11)	14,97 ^{cd} (0,12)	14,31 ^f (0,30)
C16:1	1,68 ^f (0,01)	1,74 ^f (0,02)	2,32 ^b (0,02)	1,83 ^{de} (0,03)	2,41 ^a (0,02)	1,96 ^c (0,05)	1,85 ^d (0,04)	1,53 ^g (0,02)	1,60 ^g (0,02)	1,31 ^h (0,02)	2,00 ^c (0,06)	1,76 ^{ef} (0,08)
C17:0	0,14 ^{abcd} (0,01)	0,13 ^{cd} (0,01)	0,16 ^a (0,01)	0,14 ^{bcd} (0,01)	0,15 ^{abc} (0,01)	0,14 ^{bcd} (0,01)	0,14 ^{bcd} (0,01)	0,13 ^d (0,01)	0,15 ^{ab} (0,01)	0,14 ^{cd} (0,01)	0,15 ^{ab} (0,01)	0,13 ^d (0,01)
C17:1	0,27 ^{fg} (0,01)	0,28 ^{ef} (0,01)	0,33 ^{ab} (0,01)	0,30 ^{cd} (0,01)	0,31 ^{abc} (0,01)	0,30 ^{cde} (0,01)	0,32 ^{abc} (0,01)	0,30 ^{cde} (0,01)	0,31 ^{bc} (0,01)	0,24 ^g (0,01)	0,34 ^a (0,01)	0,28 ^{de} (0,02)
C18:0	2,32 ^b (0,01)	2,11 ^d (0,03)	1,93 ^e (0,02)	2,22 ^c (0,05)	1,84 ^f (0,02)	2,11 ^d (0,02)	1,83 ^f (0,02)	2,37 ^b (0,02)	2,31 ^b (0,02)	3,25 ^a (0,02)	1,99 ^e (0,09)	2,13 ^d (0,02)
C18:1	72,50 ^{ef} (0,25)	74,39 ^{abc} (0,22)	73,16 ^{de} (0,58)	74,08 ^{bc} (0,15)	72,78 ^{ef} (0,09)	73,75 ^{cd} (0,60)	74,67 ^{ab} (0,32)	75,09 ^a (0,13)	72,19 ^f (0,23)	73,70 ^{cd} (0,34)	73,92 ^c (0,42)	74,92 ^a (0,33)
C18:2	5,61 ^b (0,16)	4,14 ^g (0,07)	4,97 ^{cd} (0,08)	4,86 ^{de} (0,05)	4,90 ^{cd} (0,12)	4,58 ^f (0,17)	4,24 ^g (0,06)	4,67 ^{ef} (0,05)	7,25 ^a (0,04)	7,19 ^a (0,10)	4,80 ^{de} (0,10)	5,09 ^c (0,06)
C18:3	0,63 ^d (0,01)	0,65 ^d (0,01)	0,71 ^{bc} (0,01)	0,68 ^c (0,02)	0,58 ^e (0,04)	0,69 ^c (0,01)	0,72 ^{abc} (0,01)	0,75 ^a (0,02)	0,74 ^{ab} (0,01)	0,71 ^{bc} (0,01)	0,71 ^{abc} (0,01)	0,69 ^c (0,01)
C20:0	0,36 ^{ab} (0,01)	0,34 ^{b-e} (0,01)	0,33 ^{cde} (0,01)	0,35 ^{a-d} (0,01)	0,31 ^{fg} (0,01)	0,34 ^{bcd} (0,01)	0,31 ^g (0,01)	0,35 ^{abc} (0,01)	0,34 ^{bcd} (0,01)	0,37 ^a (0,01)	0,32 ^{efg} (0,01)	0,33 ^{def} (0,01)
C20:1	0,24 ^{ab} (0,01)	0,22 ^{cd} (0,01)	0,25 ^a (0,01)	0,23 ^{bc} (0,01)	0,22 ^{cd} (0,01)	0,23 ^{bc} (0,01)	0,26 ^a (0,01)	0,23 ^{bcd} (0,01)	0,24 ^{ab} (0,01)	0,21 ^d (0,01)	0,25 ^a (0,01)	0,23 ^{bc} (0,01)
C22:0	0,09 ^{ab} (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,09 ^b (0,01)	0,10 ^a (0,01)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,10 ^a (0,01)
C24:0	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,02)	0,04 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)

^{a,b,c...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=9 (teste de Scheffé)

As análises realizadas: percentagem (%) de acidez, índice de peróxidos (IP) e índices espectrofotométricos (K270 e K232), tiveram como objetivo principal confirmar a classificação das amostras como azeite virgem extra. De acordo com Ranalli *et al* (2000), estes parâmetros não são considerados bons marcadores para a rastreabilidade geográfica de azeites virgens pois são muito dependentes das condições de colheita, transporte e armazenamento da azeitona e também das condições tecnológicas utilizadas na extração do azeite. De acordo com os resultados obtidos nestes parâmetros, todas as amostras analisadas foram classificadas como azeite virgem extra, ou seja obtiveram valores de percentagem de acidez inferiores a 0,8%, um valor de índice de peróxidos inferior a 20 e índices espectrofotométricos na região do ultra-violeta inferiores a 0,200 (K270) e a 2,500 (K232). O valor da viscosidade também não foi considerado na análise dos resultados, uma vez que não teve uma variação significativa e consistente entre margens do rio nem entre estados de maturação. Em relação aos pigmentos clorofilinos e carotenoides, verificou-se que as amostras em estudo apresentam um teor elevado, quando comparado com outros autores. Assim, o conteúdo em compostos clorofilinos variou entre 10,58 mg/Kg na amostra extraída de azeitonas maduras na freguesia de Reguengos de Monsaraz, concelho de Reguengos de Monsaraz (DMR), na margem direita do rio Guadiana e 17,99 mg/Kg na amostra obtida de azeitonas verdes na freguesia de Santo Agostinho, concelho de Moura (EVC), na margem esquerda do rio Guadiana. Em relação ao teor de carotenoides, o valor variou entre 4,37 mg/Kg no azeite extraído de azeitonas verdes na freguesia de São Brissos, concelho de Beja (DVF), na margem direita do rio Guadiana e 6,71 mg/Kg na amostra obtida de azeitonas verdes na freguesia de Salvador, concelho de Serpa (EVE), na margem esquerda do rio Guadiana. Utilizando o mesmo método de determinação, Motilva *et al* (2000) analisou azeites extraídos da cultivar Arbequina com diferentes estados de maturação na região de Lleida em Espanha obtendo valores compreendidos entre 6,44 mg/Kg e 17,63 mg/Kg para os compostos clorofilinos e entre 6,04 mg/Kg e 13,37 mg/Kg para os carotenóides. Já Karabagias *et al* (2013) realizaram um ensaio com 47 amostras de azeite virgem monovarietais, extraídos de seis cultivares diferentes e quatro regiões na Grécia ocidental obtendo como resultado teores de compostos clorofilinos entre 0,08 mg/Kg para a cultivar Lianolia na região de Kerkira e 4,45 mg/Kg para a cultivar Ntopia na

região de Zakynthos. Para os carotenoides os valores obtidos encontram-se entre 0,87 mg/Kg para as cultivares Thiaki na região de Kefalonia e Asprolia na região de Lefkada e 2,28 mg/Kg no azeite extraído da cultivar Koroneiki, na região de Kefalonia. Finalmente Tura *et al* (2007) realizaram um ensaio em Itália, na região de La Garda, com azeites virgens extraídos das cultivares Casaliva, Frantoio, Leccino e Pendolino, obtendo teores de compostos clorofilinos entre 0,91 mg/Kg e 10,75 mg/Kg e, para os compostos carotenoides, valores compreendidos entre os 0,97 mg/Kg e os 10, 72 mg/Kg.

O conteúdo em compostos fenólicos totais é altamente variável com uma série de factores que incluem não só a cultivar como também o estado de maturação das azeitonas, as condições edafo-climáticas da região onde se inclui a temperatura, altitude, disponibilidade de água, composição mineral do solo e ainda com as condições pós-colheita como o método de extração e armazenamento do azeite. Em relação à tabela 14, onde se encontram os principais compostos antioxidantes pode afirmar-se que, de acordo com a bibliografia consultada no capítulo das considerações teóricas e ainda com Tura *et al* (2007) que obtiveram valores para os compostos fenólicos totais a variar entre 37,1 mg/Kg e 615,5 mg/Kg e uma média de 233,3 mg/Kg nas 61 amostras de azeite obtidas a partir de 18 cultivares de azeitona em um ensaio de 5 anos em Itália, Aparicio *et al* (1999) que determinaram, para os mesmos compostos, teores entre 23,90 mg/Kg e 419,91 mg/Kg para a cultivar Hojiblanca, sendo o valor médio de 193,87 mg/Kg e entre 20,80 mg/Kg e 457,00 mg/Kg para a cultivar Picual, sendo o valor médio de 191,92 mg/Kg, pode considerar-se que o teor de compostos fenólicos totais nas amostras de azeite extraídas da cultivar Galega Vulgar neste ensaio é relativamente baixo, o que é característico nesta cultivar. Assim, obteve-se um teor mínimo médio de 72,7 mg/Kg nas amostras de azeite extraídas de azeitonas maduras na freguesia de Santiago Maior, concelho de Beja (DMB), na margem direita do rio Guadiana e um teor máximo médio de 219,6 mg/Kg nos azeites obtidos de azeitonas verdes colhidas na freguesia de Salvador no concelho de Serpa (EVE), na margem esquerda do rio Guadiana, sendo o conteúdo médio de todas as amostras de 123,5 mg/Kg. De realçar o facto de as amostras terem sido extraídas imediatamente após a colheita, em condições de extração próximas das ideais com

temperatura controlada e armazenadas a -20°C logo após a extração. Em relação aos compostos fenólicos individuais: hidroxitirosol, ácido cafeico e oleuropeína, o teor é altamente variável, o que está de acordo com a bibliografia consultada e, neste ensaio, não se encontrou uma relação directa com o teor de compostos fenólicos totais. Assim, por exemplo, a amostra que apresentou o segundo conteúdo mais alto em compostos fenólicos totais foi a que apresentou um dos teores mais baixos de hidroxitirosol, ou seja o azeite obtido de azeitonas verdes na freguesia de Sto. Agostinho, concelho de Moura na margem esquerda do rio Guadiana (EVC) com um teor de 184,3 mg/Kg de compostos fenólicos totais e um teor de 2,94 mg/Kg de hidroxitirosol. O teor mais baixo de hidroxitirosol foi de 1,08 mg/Kg, obtido no azeite extraído de azeitonas maduras na freguesia de Reguengos de Monsaraz, concelho de Reguengos de Monsaraz, na margem direita do rio (DMR) e o teor mais elevado 26,15mg/ Kg, obtido nas amostras de azeite extraídas de azeitonas verdes na freguesia de Salvador, concelho de Serpa (EVE). Em relação à composição em tocoferóis, a cultivar Galega Vulgar, neste ensaio, apresenta um teor relativamente elevado, especialmente em tocoferol α e tocoferol γ . O teor em tocoferol α variou entre 209,62 mg/Kg nas amostras obtidas de azeitonas verdes na freguesia de Reguengos de Monsaraz, margem direita do rio Guadiana e 307,34 mg/Kg nos azeites virgens extraídos de azeitonas maduras na freguesia de Salvador, concelho de Serpa, na margem esquerda do rio, sendo a média neste ensaio para esta cultivar de 260 mg/Kg. Para o tocoferol γ , o teor situou-se entre 9,08 mg/Kg para as amostras extraídas de azeitonas verdes, na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja (DVF) e 12,54 mg/Kg para os azeites obtidos de azeitonas verdes na freguesia de Sto. Agostinho, concelho de Moura (EVC). O valor médio para todas as amostras foi de 11,27 mg/Kg. Em relação ao tocoferol β , os valores são medianos, variando entre 1,35 mg/Kg nos azeites verdes da freguesia de Salvador no concelho de Serpa (EVE) e 2,17 mg/Kg nas amostras extraídas de azeitonas maduras na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja (DMF). De facto, num ensaio realizado por Aguilera *et al* (2005) na Andalusia, Espanha, os autores obtiveram teores de tocoferol α entre 148 mg/Kg na cultivar Frantoio e 306 mg/Kg na cultivar Leccino e para o tocoferol γ teores entre 0,75 mg/Kg na cultivar Frantoio e 12,3 mg/Kg na cultivar Leccino. O teor de tocoferol β ficou compreendido entre os 1,67 mg/Kg da cultivar Frantoio e os 2,75 mg/Kg da cultivar Leccino. Também na Andalusia,

num ensaio de 3 anos com a cultivar Hojiblanca Beltrán *et al* (2005), que concluíram ser esta uma cultivar com elevado conteúdo em tocoferóis, encontrou teores de tocoferol α entre 232 mg/Kg e 370 mg/Kg, teores de tocoferol γ entre 2,21 mg/Kg e 12,42 mg/Kg e, para o tocoferol β , o valor situou-se entre 1,65 mg/Kg e 4,28 mg/Kg. Em relação à estabilidade oxidativa, medida em horas pelo Rancimat, pode considerar-se que o valor foi relativamente baixo, mantendo-se entre as 10,7 horas nos azeites extraídos de azeitonas verdes na freguesia de Reguengos de Monsaraz (DVR) e as 27,6 horas nas amostras extraídas de azeitonas verdes na freguesia de Sto. Agostinho (EVC). A média para todas as amostras foi de 19,02 horas. De realçar o facto de, na bibliografia se encontrarem valores muito díspares, provavelmente devido ao facto de as condições da análise serem muito variáveis, principalmente em relação à temperatura a que são sujeitas as amostras durante o procedimento analítico e também por este ser um resultado muito dependente da composição do azeite, principalmente em relação aos compostos antioxidantes e à composição em ácidos gordos. Assim, num ensaio realizado por Baer (2006), com as mesmas condições analíticas e, para azeites extraídos da mesma cultivar no concelho de Moura obtiveram-se valores de estabilidade oxidativa superiores, variando entre as 27,2 horas e as 43,9 horas, estando, possivelmente, as diferenças no resultado relacionadas com o elevado conteúdo em tocoferóis determinado nestas amostras: teores de tocoferol α entre 247,6 mg/Kg e 329,7 mg/Kg e de tocoferol γ entre 14,4 mg/Kg e 20,8 mg/Kg. A grande diferença encontrada no conteúdo em tocoferóis α e γ para as amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega Vulgar, na mesma região mas em anos diferentes está de acordo com as conclusões de Beltrán *et al* (2005) quando referem que, entre os factores agrónómicos, o ano da colheita foi o factor que mais influenciou o teor de tocoferóis nas amostras estudadas.

Na tabela 15 encontra-se a composição em ácidos gordos das diferentes amostras. Como se pode observar, a composição em ácidos gordos dos azeites virgens oriundos das duas margens do rio Guadiana está, em termos gerais, de acordo com os resultados obtidos para a mesma cultivar em outras zonas do país. As amostras apresentam um teor médio de ácido oleico, variando entre 72,19% no azeite extraído de azeitonas verdes na freguesia de Reguengos de Monsaraz, concelho de Reguengos

de Monsaraz (DVR) e 75,09% no azeite obtido de azeitonas maduras na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja, sendo a média de 73,76%. Em relação aos ácidos gordos polinsaturados, ácido linoleico (C18:2) e ácido linolénico (C18:3), a cultivar Galega vulgar apresenta um conteúdo baixo, sendo o valor médio de ácido linoleico de 5,15% e de ácido linolénico de 0,69%. O resultado das análises mostrou um conteúdo em ácido palmítico (C16:0), ácido gordo saturado, elevado, com um valor médio de 15,03%.

Para facilitar a comparação entre os azeites virgens extraídos de azeitonas verdes e maduras com origem nas duas margens do rio Guadiana procedeu-se à representação gráfica dos parâmetros analisados expostos nas tabelas 13, 14 e 15, o que facilita a sua interpretação.

Assim, aplicou-se o método de construção de gráficos “Box and Whisker”, para os parâmetros considerados mais importantes na caracterização geográfica das amostras de azeite: compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, oleuropeína, tocoferóis α , β e γ , pigmentos clorofilinos e carotenoides, estabilidade oxidativa, relação AGMI/ AGPI e os principais ácidos gordos: ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1); ácido linoleico (C18:2) e ácido linolénico (C18:3). Os gráficos de caixa “Box and Whisker” permitem a comparação dos resultados obtidos nos parâmetros selecionados colocando em evidência os dois fatores em estudo: a maturação da azeitona e a margem do rio. O gráfico coloca uma caixa em torno da média que representa o intervalo selecionado (erro padrão) e uma barra vertical que atravessa a caixa e representa o desvio padrão.

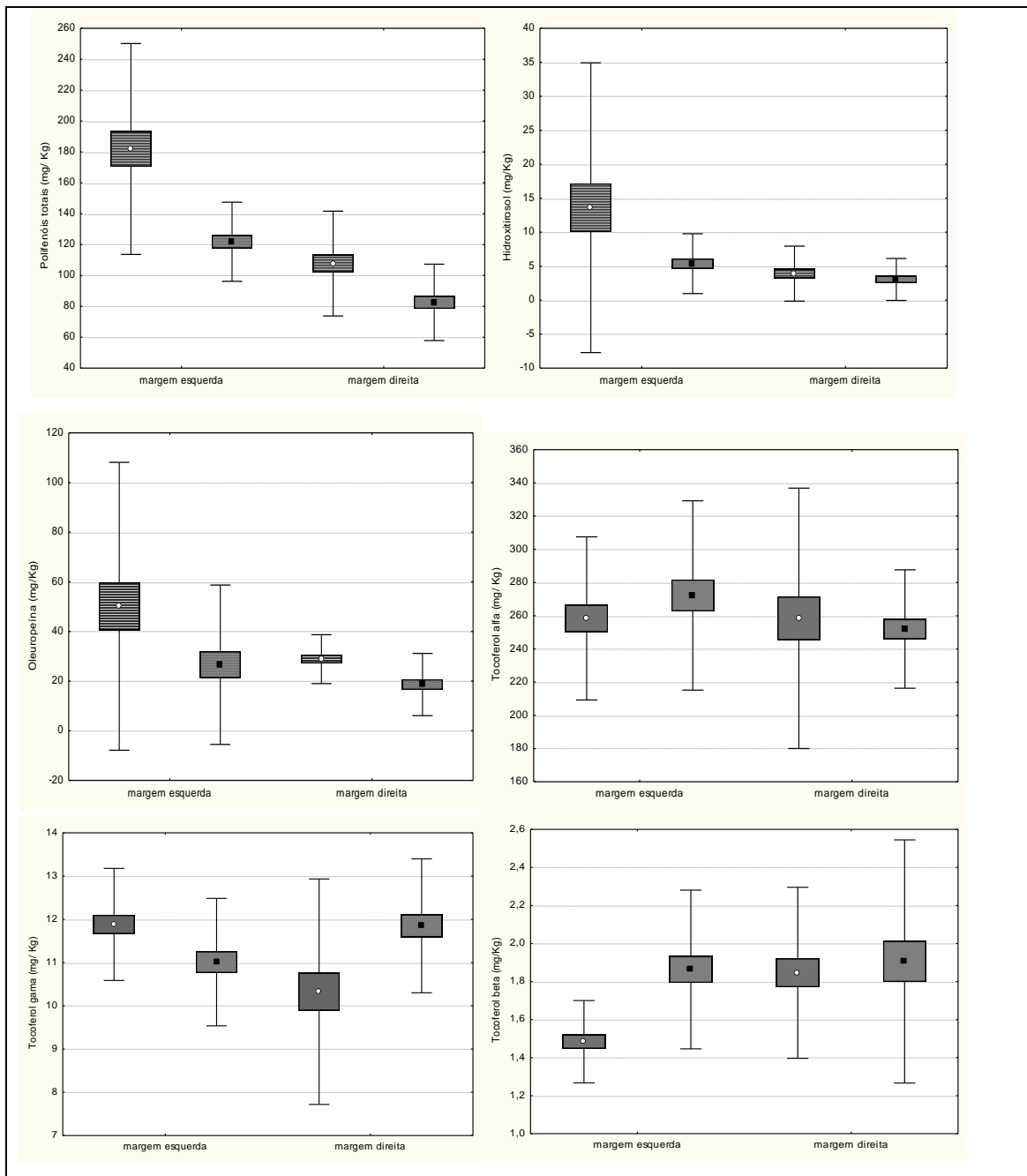


Figura 8 Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos parâmetros polifenóis totais, hidroxitirosol, oleuropeína e tocoferóis alfa, beta e gama das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes (o) e maduras (■) Média: ponto central; erro padrão: caixa; desvio padrão: barra.

Observando a figura 8 verifica-se que as amostras de azeite provenientes de azeitonas verdes da margem esquerda do rio Guadiana se destacam em relação às da margem direita devido ao superior conteúdo em polifenóis totais e também nos compostos fenólicos hidroxitirosol e oleuropeína. Estes compostos diminuíram com a maturação

para todas as amostras, uma vez que a sua elevada atividade antioxidante favorece a sua degradação e desaparecimento (Ouni *et al*, 2011; Yorulmaz, 2013). Assim, obteve-se uma média de 181,9 mg/Kg e de 121,8 mg/Kg de polifenóis totais para as amostras de azeite verde e azeite maduro provenientes da margem esquerda do rio e 107,7 mg/Kg e 82,6 mg/Kg para as amostras de azeite virgem verde e maduro das amostras provenientes da margem direita do rio, o que está em acordo com Beltrán *et al* (2005). Em relação ao teor em hidroxitirosol obteve-se uma média de 13,6 mg/Kg e de 5,37 mg/Kg para as amostras de azeite provenientes de azeitonas verdes e maduras da margem esquerda e de 3,91 mg/Kg e 3,05 mg/Kg para os azeites virgens provenientes de azeitonas verdes e maduras da margem direita do rio Guadiana. De realçar o fato de os conteúdos em compostos fenólicos totais, hidroxitirosol e oleuropeína, principalmente para as amostras provenientes de azeitonas verdes e da margem esquerda, apresentarem uma grande amplitude, medida pela barra do desvio padrão. Assim para estes azeites o conteúdo em hidroxitirosol varia entre 2,94 mg/ Kg e 26, 15 mg/Kg. Para o conteúdo em oleuropeína a tendência foi a mesma: as amostras de azeite provenientes de azeitonas verdes da margem esquerda do rio apresentaram os valores mais elevados, sendo a amplitude dos valores bastante considerável. Estas amostras apresentaram um valor médio de 50,13 mg/Kg, um valor mínimo de 28,51 mg/Kg e um valor máximo de 87,90 mg/Kg.

Em relação ao conteúdo em tocoferóis α , β e γ e, ao contrário do referido por Beltrán *et al* (2005), não se verificou qualquer relação significativa com o estado de maturação das azeitonas. Também não se encontrou relação com a proveniência geográfica das amostras o que está de acordo com os trabalhos de Psomiadou *et al* (2000). Assim, para os azeites verdes da margem esquerda do rio obtiveram-se os valores médios de 258,39 mg/Kg para o tocoferol α , 1,48 mg/Kg para o tocoferol β e 11,88 mg/Kg para o tocoferol γ . Para os azeites maduros os resultados médios foram 272,19 mg/Kg, 1,86 mg/Kg e 11,01 mg/Kg respetivamente para os tocoferóis α , β e γ .

Para os azeites da margem direita do rio os valores médios foram de 258,43 mg/Kg, 1,91 mg/Kg e 10,33 mg/Kg para os tocoferóis α , β e γ existentes nas amostras de azeite extraído de azeitonas verdes e 251,97 mg/Kg, 1,91 mg/Kg e 11,85 mg/Kg,

respetivamente, para os azeites extraídos das azeitonas maduras. Estes valores estão de acordo com a bibliografia consultada no capítulo das considerações teóricas.

Na figura 9 apresentam-se os gráficos “Box and Whisker” para os pigmentos clorofilinos e carotenoides, estabilidade oxidativa (rancimat) e relação AGMI/AGPI.

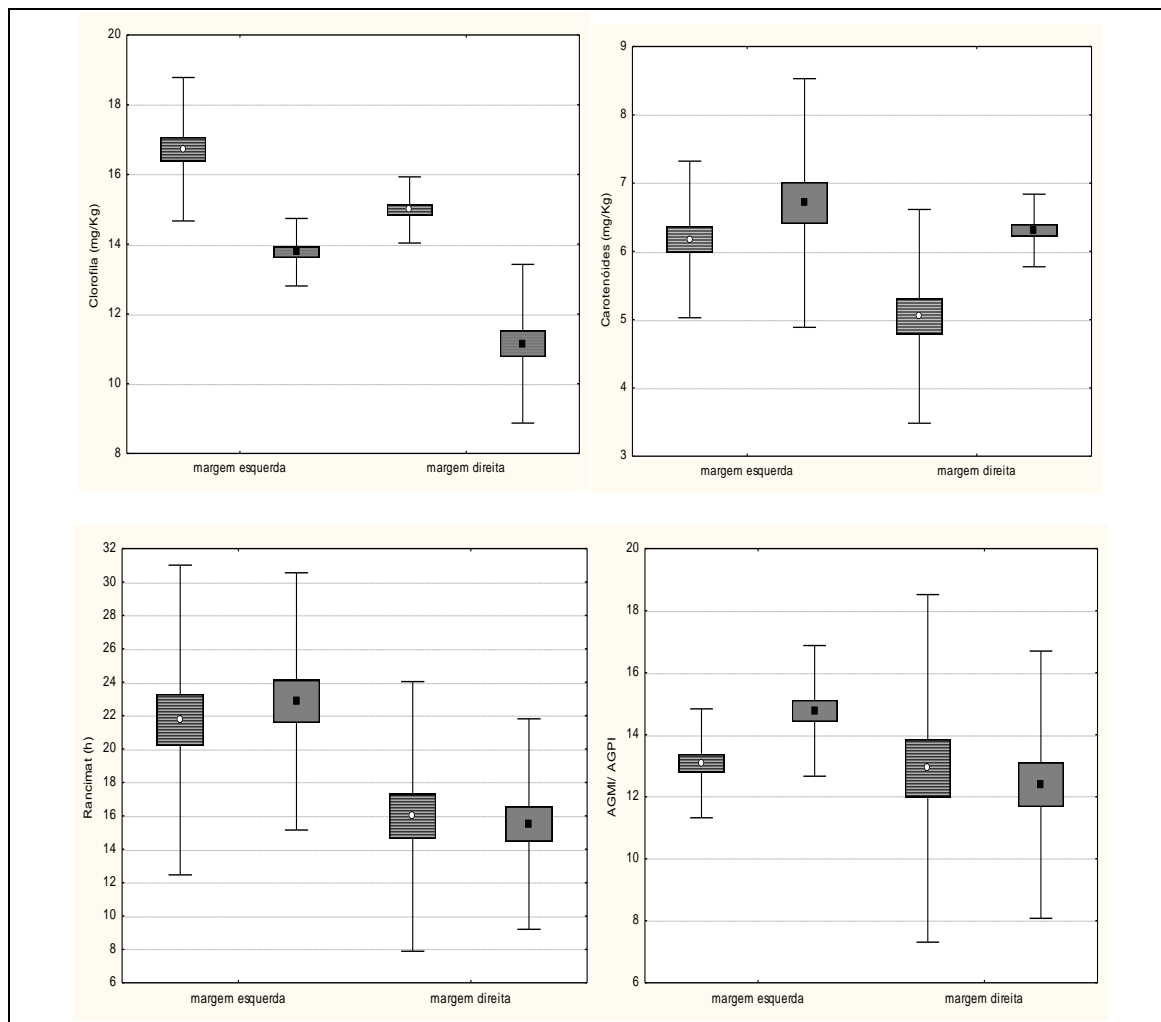


Figura 9 Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos parâmetros clorofila, carotenóides, estabilidade oxidativa (rancimat) e relação AGMI/AGPI das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes (o) Média: ponto central; erro padrão: caixa; desvio padrão: barra.

Para além da sua atividade antioxidante, os pigmentos são responsáveis pela cor do azeite, que é um dos fatores que influenciam a escolha do consumidor e é considerado um parâmetro de qualidade do azeite (Beltrán *et al*, 2005). Em relação ao conteúdo em clorofila, verifica-se que as amostras de azeite verde provenientes da margem esquerda do rio Guadiana apresentam um teor médio consideravelmente mais elevado do que as restantes amostras. Este conteúdo diminuiu marcadamente com o

avanço da maturação das azeitonas, o que está de acordo com Oueslati *et al* (2009) que referem uma diminuição da atividade fotossintética com a maturação das azeitonas, levando a um decréscimo progressivo do teor de pigmentos clorofilinos e carotenóides. O mesmo afirmam Baccouri *et al* (2007), Baccouri *et al* (2008) e Velasco *et al* (2002) em relação aos pigmentos clorofilinos. Em relação à evolução dos carotenoides com a maturação, os resultados obtidos com este ensaio não estão de acordo com a bibliografia uma vez que se verificou um aumento do conteúdo médio destes pigmentos, embora não muito acentuado, com a maturação, para os azeites extraídos em ambas as margens do rio. Assim, nos azeites da margem esquerda do rio Guadiana obtiveram-se os valores médios de 16,73 mg/Kg e de 6,18 mg/Kg para os pigmentos clorofilinos e carotenoides, respetivamente, nos azeites verdes e de 13,77 mg/Kg e 6,71 mg/Kg para os azeites maduros. Os azeites verdes da margem direita alcançaram os valores médios de 14,98 mg/Kg e de 5,05 mg/Kg para os pigmentos clorofilinos e para os carotenoides, respetivamente, e os maduros registaram 11,05 mg/Kg e 6,31 mg/Kg.

Em relação à estabilidade oxidativa, medida em horas pelo rancimat, verifica-se que as amostras da margem esquerda do rio Guadiana apresentam valores médios sempre superiores aos azeites da margem direita, independentemente do estado de maturação das azeitonas que lhes deram origem. Isto deve-se provavelmente ao fato de serem estas as amostras que apresentaram também um conteúdo mais elevado em compostos antioxidantes como compostos fenólicos totais, hidroxitirosol e oleuropeína. Verifica-se também uma relação, embora não tão acentuada, com a relação AGMI/ AGPI, principalmente quando comparamos os azeites verdes e maduros para cada margem do rio e não entre margens. Estas relações estão amplamente confirmadas pelos inúmeros autores que realizaram trabalhos sobre o tema da estabilidade oxidativa dos azeites virgens (Baer, 2006; Morelló *et al*, 2004; Tura *et al*, 2007; Velasco *et al*, 2002).

Na figura 10 apresentam-se os gráficos “Box and Whisker” para os principais ácidos gordos existentes no azeite: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3).

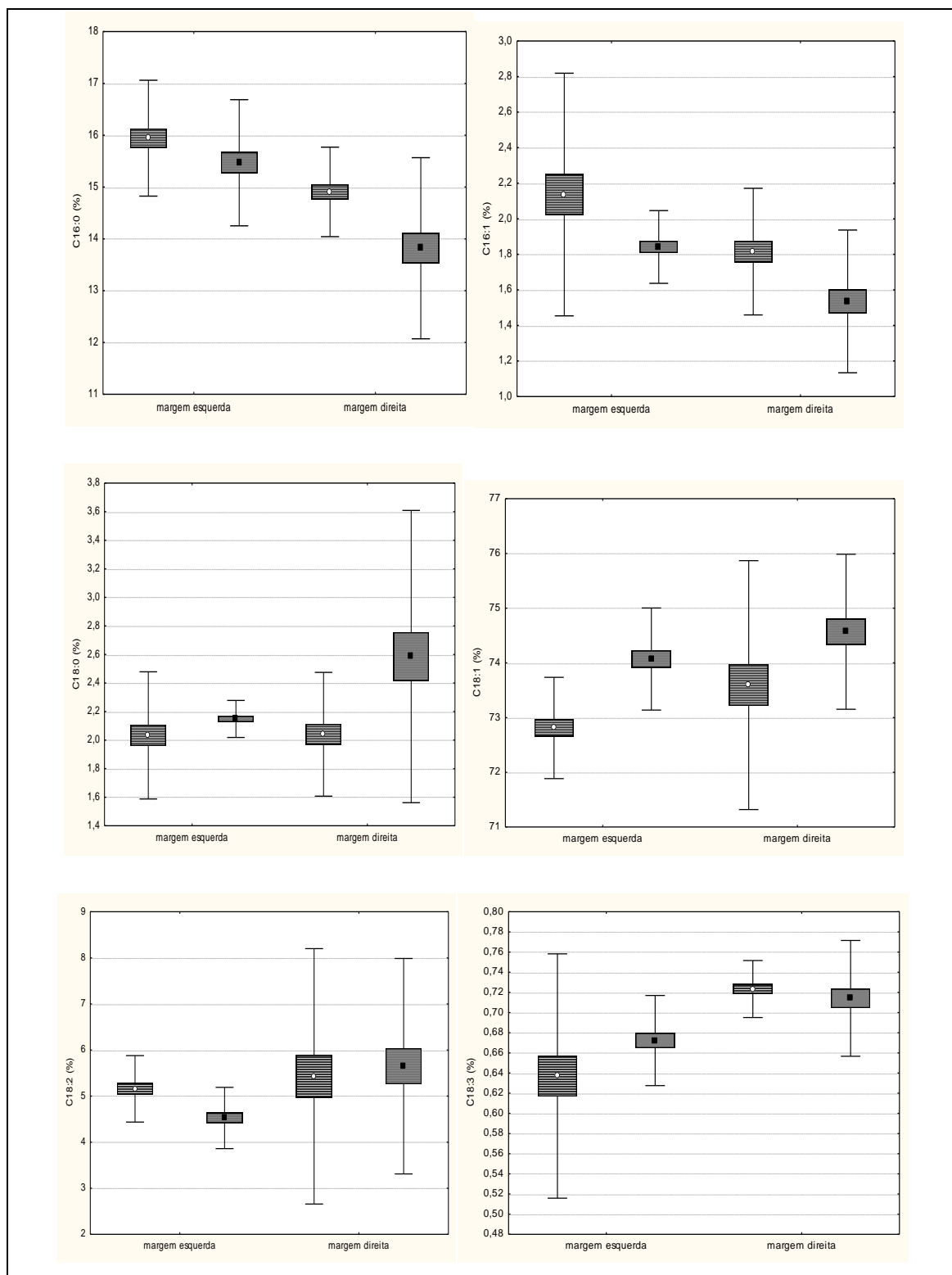


Figura 10 - Representação gráfica do tipo “Box and Whisker” referente aos principais ácidos gordos das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Galega vulgar a partir de azeitonas verdes (o) e maduras (■) Média: ponto central; erro padrão: caixa; desvio padrão: barra.

Em relação ao perfil de ácidos gordos das amostras em estudo, verificaram-se diferenças muito consideráveis no conteúdo médio dos seis principais ácidos gordos, tanto em relação à maturação, como em relação à área geográfica de origem dos azeites. Em relação à maturação, verificou-se uma diminuição no conteúdo dos ácidos gordos palmítico (C16:0) e palmitoleico (C16:1) e um aumento dos ácidos esteárico (C18:0) e oleico (C18:1) para os azeites virgens provenientes das duas margens do rio Guadiana. Os ácidos mais insaturados, linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), tiveram uma evolução inversa nos azeites das duas margens do rio: enquanto que, para as amostras provenientes da margem esquerda, houve uma diminuição do conteúdo médio em ácido linoleico e um aumento do ácido linolénico, para os azeites da margem direita houve um aumento do teor médio de ácido linoleico e uma diminuição no conteúdo de ácido linolénico com a maturação. Estes resultados estão, em parte, de acordo com os autores consultados na bibliografia (ver ponto 2.1 das considerações teóricas) que refere uma diminuição dos ácidos palmítico e palmitoleico com a maturação e uma não concordância na evolução dos ácidos linoleico e linolénico. Em relação ao local de origem das amostras verificou-se que, independentemente do estado de maturação, os azeites com origem na margem esquerda do rio Guadiana apresentaram um teor médio de ácido palmítico sempre superior aos extraídos na margem direita. Assim, o valor médio do ácido palmítico para os azeites da margem esquerda foi de 15,94% e de 15,47%, respetivamente para os verdes e maduros e para os da margem direita foi de 14,91% e de 13,82% para os verdes e maduros. A mesma tendência também se verificou para o ácido linoleico, embora não tão acentuada, uma vez que a variabilidade entre amostras foi bastante superior, como se pode ver na barra vertical do gráfico. Para o ácido oleico, verifica-se uma tendência para que as amostras extraídas na margem direita do rio tenham um teor médio mais elevado do que as extraídas na margem esquerda. No entanto esta tendência não é absoluta, pois só se verifica quando se comparam amostras no mesmo estado de maturação. Assim, o conteúdo médio em ácido oleico foi de 72,80% e 74,07% respetivamente para os azeites verdes e maduros obtidos na margem esquerda e de 73,59% e 74,57% para os verdes e maduros extraídos na margem direita do rio Guadiana. De acordo com a bibliografia (Aguilera *et al*, 2005), o perfil de ácidos gordos pode variar com a altitude, a insaturação aumentar com a latitude e o conteúdo em ácido oleico diminuir com o

aumento da temperatura na altura da formação do azeite no fruto. Assim, verifica-se que as temperaturas médias, principalmente na primavera e verão, são tradicionalmente mais elevadas nos concelhos da margem esquerda do rio Guadiana, o que pode ter levado a que estas amostras apresentem uma tendência para um valor inferior de ácido oleico. Observando a tabela 15 verifica-se que o conteúdo em ácido linoleico das amostras provenientes do concelho de Reguengos de Monsaraz (margem direita) apresentam um valor muito superior e significativamente diferente de todas as outras (para $p < 0,05$), o que contribuiu para que, em termos médios, o teor de ácido linoleico nestas amostras seja mais elevado do que nas amostras da margem esquerda e, principalmente, que apresente um desvio padrão (barra vertical) muito elevado (figura 10).

Na tentativa de separar as amostras de azeite virgem provenientes da cultivar Galega vulgar em grupos, de acordo com a maturação e, principalmente, com a origem geográfica (margem esquerda e direita do rio Guadiana) foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados das análises químicas efetuadas a todas as amostras referentes a 18 atributos, nomeadamente: clorofila, carotenóides, compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, oleuropeína, tocoferol α , tocoferol β , tocoferol γ , estabilidade oxidativa (rancimat), relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) e os ácidos gordos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), margárico (C17:0), margaroleico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3). Na tabela 16 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 16 Valores próprios e extração dos componentes principais

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	6,54	36,36	6,54	36,36
2	4,25	23,64	10,80	60,00
3	2,22	12,32	13,02	72,32
4	1,87	10,41	14,89	82,73
5	1,21	6,73	16,10	89,46
6	0,55	3,06	16,65	92,52
7	0,34	1,92	17,00	94,44
8	0,25	1,42	17,25	95,86
9	0,22	1,20	17,47	97,06
10	0,18	1,01	17,65	98,07
11	0,11	0,63	17,77	98,70
12	0,09	0,52	17,86	99,22
13	0,07	0,39	17,93	99,61
14	0,04	0,21	17,97	99,82
15	0,02	0,08	17,98	99,90
16	0,01	0,06	17,99	99,96
17	0,00	0,03	18,00	99,99
18	0,00	0,00	18,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 60% da variância: 36,4% para o primeiro componente e 23,6% para o segundo. Note-se que apesar de se terem considerado apenas os 2 primeiros componentes, os terceiro, quarto e quinto componentes também apresentaram valor próprio superior a 1. Só estes componentes foram significativos, uma vez que são os que apresentaram maior valor próprio. Estando em análise 18 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 18 atributos são transformados em 18 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 6,5 e o segundo valor próprio 4,2.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (tabela 17).

Tabela 17 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Clorofila (mg/Kg)	0,840*	0,383
Carotenóides (mg/Kg)	0,162	-0,167
Polifenóis totais (mg/Kg)	0,763*	0,444
Hidroxitirosol (mg/Kg)	0,497	0,148
Oleuropeína (mg/Kg)	0,647	0,297
Tocoferol α (mg/Kg)	0,375	-0,612
Tocoferol β (mg/Kg)	-0,180	-0,865*
Tocoferol γ (mg/Kg)	0,018	0,196
Rancimat (horas)	0,667	-0,379
AGMI/AGPI	0,549	-0,784*
C16:0 (%)	0,839*	-0,056
C16:1 (%)	0,937*	0,072
C17:0 (%)	0,487	0,591
C17:1 (%)	0,650	-0,086
C18:0 (%)	-0,836*	0,296
C18:1 (%)	-0,251	-0,890*
C18:2 (%)	-0,602	0,763*
C18:3 (%)	-0,532	-0,158

* correlações significativas ($r > 0,7$), segundo Liu *et al.* (2003)

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, pelo ácido esteárico (C18:0), com valor de correlação negativo, e pelos clorofila, compostos fenólicos totais, oleuropeína, estabilidade oxidativa (rancimat), ácido palmítico (C16:0) e ácido palmitoleico (C16:1), com valor de correlação positivo.

O 2º componente principal, CP2, é explicado pelos, tocoferol β , relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI), ácido margaroleico (C17:1) e ácido oleico (C18:1), com valor de correlação negativo e pelo ácido linoleico (C18:2), com valor de correlação positivo. Assim, na figura 11 pode observar-se a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

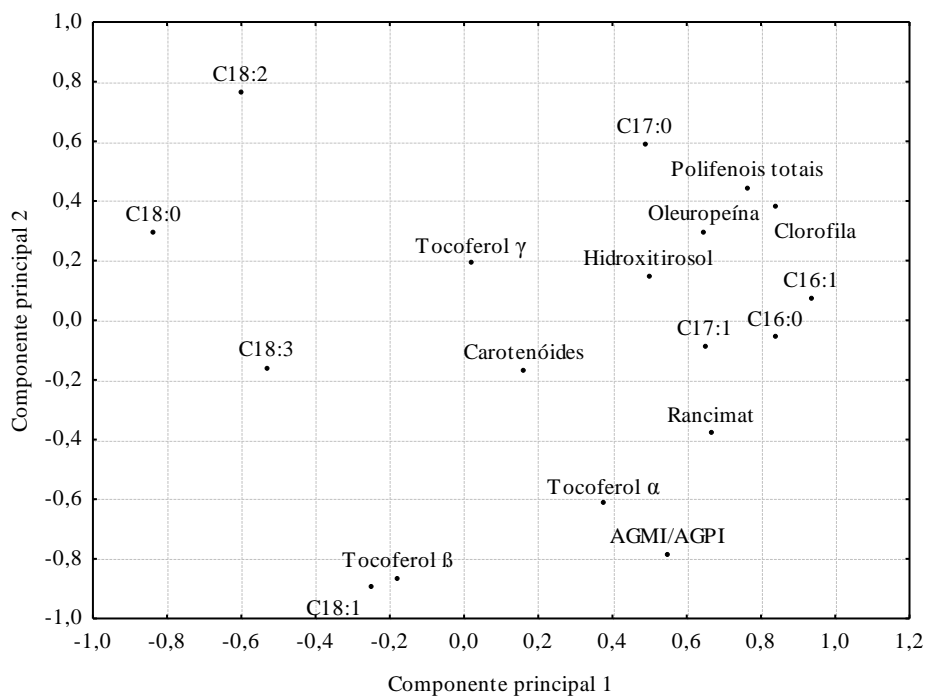


Figura 11 Distribuição dos atributos no plano

E na figura 12 pode observar-se a projeção das amostras de azeite virgem nos dois estados de maturação e nas duas margens do rio Guadiana no Plano principal.

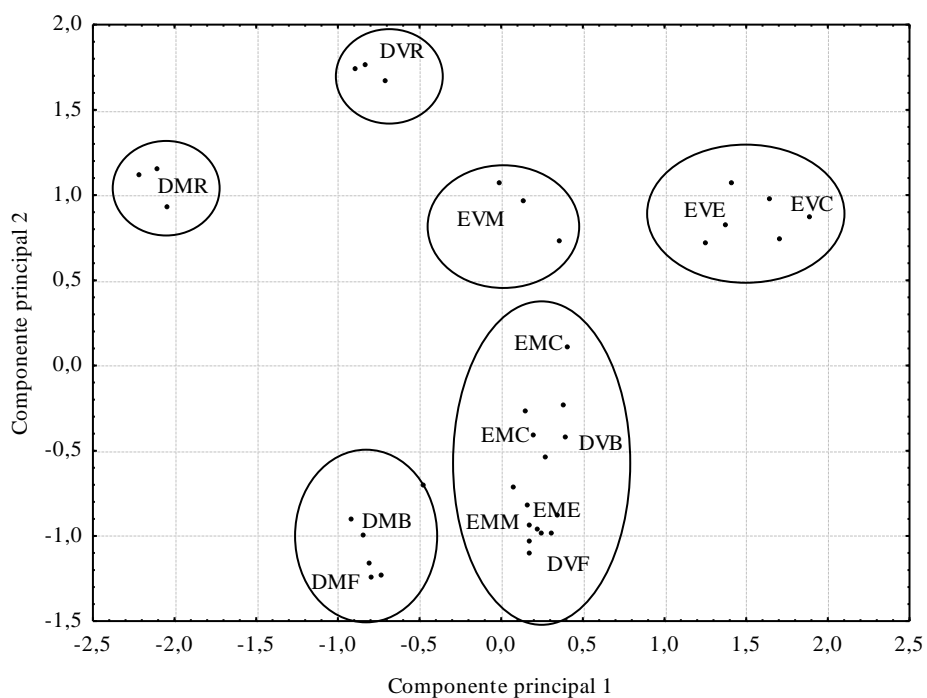


Figura 12 Projeção das amostras nos dois estados de maturação e nos dois locais no plano principal.

De acordo com as figuras 11 e 12, verifica-se a separação de algumas amostras em relação ao estado de maturação, principalmente devido ao conteúdo em ácido oleico (C18:1) e à relação AGMI/AGPI nos azeites obtidos de azeitonas maduras, de ambas as margens do rio. As amostras de azeite obtidas na margem esquerda do rio Guadiana de azeitonas no estado de maturação verde separam-se dos outros azeites devido ao conteúdo em compostos fenólicos totais e ao teor em oleuropeína e hidroxitirosol e também em clorofila, sendo assim os azeites com uma cor verde mais acentuada, mais amargos e picantes. De realçar as amostras de azeite da margem direita do rio, DVR e DMR (provenientes do concelho de Reguengos de Monsaraz), nos dois estados de maturação, que se destacaram de todas as outras pelo seu mais elevado conteúdo em ácido linoleico (C18:2).

5.3.4 – Rastreabilidade geográfica dos azeites virgens extraídos da cultivar Galega vulgar nas duas margens do rio Guadiana através da composição mineral elemental

A análise dos elementos vestigiais é muito importante tanto na deteção de adulterações como na caracterização dos azeites virgens (Zeiner *et al*, 2005). A presença de elementos metálicos no azeite tem origem principalmente nos solos onde estão implantados os olivais mas também podem ser introduzidos durante o processo de extração e embalamento. Assim, pode assumir-se que a distribuição destes elementos vestigiais nos azeites varia de acordo com a sua origem e que o tratamento estatístico dos respetivos valores poderá permitir a caracterização geográfica dos diferentes azeites virgens (Karabagias *et al*, 2013).

O objectivo da primeira análise estatística dos resultados focou-se na observação das diferenças na concentração dos elementos vestigiais nos solos provenientes das diferentes freguesias das margens esquerda e direita do rio Guadiana e nas respectivas amostras de azeite virgem e bagaço de azeitona.

Nas tabelas 18, 19 e 20 apresentam-se os valores médios, desvios-padrão e resultados da análise de variância para todas os elementos minerais seleccionados para a caracterização das amostras de solos, azeite virgem e bagaço de azeitona.

Tabela 18 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes solos (mg/Kg).

	Margem esquerda			Margem direita		
	Sto. Agostinho (Moura)	S. João Baptista (Moura)	Salvador (Serpa)	S.Brissos (Beja)	Santiago Maior (Beja)	Reguengos Monsaraz (Reguengos)
Li	16,28(2,92) ^e	40,24(2,11) ^d	61,90(1,38) ^c	124,98(1,62) ^a	61,92(2,28) ^c	104,11(3,74) ^b
B	104,18(0,68) ^e	103,07(0,28) ^e	209,10(1,30) ^c	1477,02(1,22) ^a	110,80(1,75) ^d	342,90(94) ^b
V	32,73(1,46) ^e	104,88(2,05) ^d	111,75(0,97) ^d	1268,37(29,20) ^a	234,92(1,81) ^c	417,45(0,59) ^b
Cr	32,63(0,93) ^f	124,32(1,26) ^d	91,82(0,45) ^e	649,61(0,52) ^a	134,26(1,22) ^c	324,71(0,79) ^b
Co	9,84(1,60) ^e	41,98(0,30) ^d	48,09(0,65) ^c	341,84(0,34) ^a	47,67(1,52) ^c	72,47(0,50) ^b
Ni	14,35(0,24) ^f	61,22(0,27) ^e	98,96(0,25) ^d	322,10(0,16) ^a	123,82(1,59) ^b	111,59(0,25) ^c
Cu	20,89(0,47) ^f	206,89(0,28) ^b	72,28(0,43) ^e	337,15(0,42) ^a	130,88(0,22) ^c	84,68(0,30) ^d
Zn	7,84(0,33) ^e	713,79(0,27) ^a	161,25(1,17) ^d	345,24(18,29) ^b	155,02(0,86) ^d	247,63(0,43) ^c
Ga	16,33(0,49) ^f	183,57(0,44) ^c	73,78(0,24) ^d	390,18(1,75) ^a	73,69(0,25) ^d	237,75(0,51) ^b
Sr	27,45(0,13) ^e	27,76(0,22) ^e	50,07(0,84) ^d	359,27(0,51) ^a	130,9180,53) ^b	98,90(0,69) ^c
Cd	nd	1,22(0,04) ^a	Nd	1,18(0,03) ^a	nd	nd
Ba	140,11(0,57) ^f	1312,42(0,57) ^b	443,71(0,47) ^e	1629,65(1,35) ^a	555,82(0,77) ^d	1290,37(10,00) ^c

^{a,b,c, ...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 3$ (teste de Scheffé).

A análise dos dados mostra que existem diferenças significativas para todos os elementos analisados nas amostras de solos correspondentes aos 6 olivais selecionados, o que parece sustentar a hipótese da importância da composição do solo na rastreabilidade geográfica. Assim, os dados revelam uma diferença entre os solos das duas margens do rio Guadiana sendo, em termos gerais, as concentrações mais elevadas dos elementos analisados nas amostras de solos correspondentes aos olivais situados na margem direita e, conseqüentemente, as mais baixas, nos solos correspondentes aos olivais situados na margem esquerda. As amostras de solo colhidas na freguesia de Sto. Agostinho, concelho de Moura (margem esquerda), apresentaram os valores mais baixos para todos os elementos analisados e as amostras colhidas na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja (margem direita), os valores mais elevados para todos os elementos, excepto para o zinco (Zn). Curiosamente, o solo com o teor mais elevado de zinco e também de cobre (Cu) situa-se na margem esquerda (freguesia de S. João Baptista, concelho de Moura). De acordo com Beltrán (2015), o zinco (Zn) é incorporado no solo através de fertilizantes utilizados para aumentar a produção de azeitona. O cádmio (Cd), considerado um elemento tóxico foi detectado apenas em dois olivais, um da margem esquerda

(freguesia de S. João Baptista, concelho de Moura) e outro da margem direita do rio Guadiana (freguesia de S. Brissos, concelho de Beja).

Tabela 19 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes azeites (10 X mg/Kg)

	Margem esquerda			Margem direita		
	Sto. Agostinho (Moura)	S. João Baptista (Moura)	Salvador (Serpa)	S.Brissos (Beja)	Santiago Maior (Beja)	Reguengos Monsaraz (Reguengos)
Li	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
B	59,78(0,22) ^a	36,16(1,98) ^c	48,24(1,31) ^b	29,20(1,17) ^d	13,21(1,63) ^{de}	nd
V	0,77(0,09) ^b	0,73(0,03) ^b	0,81(0,03) ^b	1,03(0,09) ^a	0,81(0,07) ^b	0,89(0,04) ^{ab}
Cr	1,73(0,02) ^d	1,81(0,07) ^{cd}	3,29(0,03) ^b	3,66(0,14) ^a	2,04(0,10) ^c	2,03(0,13) ^{cd}
Co	1,56(0,04) ^b	1,69(0,08) ^b	0,96(0,11) ^b	1,60(0,17) ^b	2,46(0,53) ^a	2,70(0,07) ^a
Ni	0,74(0,14) ^c	1,11(0,06) ^b	2,80(0,09) ^a	3,01(0,03) ^a	0,91(0,04) ^{bc}	1,02(0,08) ^b
Cu	4,60(0,15) ^c	4,81(0,09) ^c	2,65(0,26) ^d	7,59(0,30) ^b	21,39(0,19) ^a	7,32(0,11) ^b
Zn	2,70(0,07) ^e	5,06(0,18) ^d	11,70(0,08) ^c	53,29(0,41) ^a	21,84(0,31) ^b	11,68(0,15) ^c
Ga	0,87(0,07) ^d	1,07(0,05) ^c	0,71(0,04) ^d	2,77(0,09) ^a	0,76(0,06) ^d	1,51(0,02) ^b
Sr	0,56(0,04) ^c	0,50(0,02) ^c	0,46(0,03) ^c	1,66(0,02) ^a	0,82(0,07) ^b	0,79(0,02) ^b
Cd	2,27(0,16) ^d	3,18(0,02) ^c	3,30(0,03) ^c	6,34(0,06) ^b	6,81(0,04) ^a	3,38(0,02) ^c
Ba	4,89(0,26) ^d	6,03(0,08) ^c	3,77(0,06) ^e	10,15(0,06) ^a	3,51(0,04) ^e	7,58(0,04) ^b

^{a,b,c, ...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 3$ (teste de Scheffé).

O principal objectivo dos sistemas de rastreabilidade é determinar a proveniência geográfica dos azeites virgens através da análise da sua composição química. Como as oliveiras recebem os elementos do solo, é espectável que o azeite virgem, extraído das azeitonas, contenha os mesmos elementos presentes no solo mas em concentrações inferiores. Aplicando o mesmo sistema que para os solos, analisaram-se as diferenças na concentração dos elementos nas amostras de azeite obtidas das azeitonas da cultivar Galega vulgar, colhidas nos olivais cujos solos foram também analisados. A concentração dos elementos analisados está de acordo com alguns dos dados previamente publicados por outros autores (Béltran *et al*, 2015; Benincasa *et al*, 2007; Camin *et al*, 2010; Llorent-Martínez *et al*, 2011). Os valores determinados nos diferentes azeites não estão, no entanto, directamente relacionados com os determinados nos respectivos solos uma vez que os teores dos diferentes elementos são mais aproximados entre amostras, não existindo tantas diferenças significativas. Este facto indica que não existe uma relação directa na passagem dos diferentes elementos do solo para o azeite, o que está de acordo com Román *et al* (2014) quando afirmam que o metabolismo dos elementos vestigiais pode divergir em cada sistema

solo - planta. Verifica-se, no entanto, a tendência para as amostras de azeite obtidas nos olivais da margem esquerda, principalmente no azeite obtido na freguesia de Sto. Agostinho, concelho de Moura, apresentarem teores inferiores dos elementos analisados, do que as amostras obtidas na margem direita, principalmente na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja, como se verificou na análise dos solos. Esta evidência poderá ser favorável na rastreabilidade geográfica dos azeites a partir da comparação da análise elemental dos solos e azeites.

De acordo com Sahan *et al* (2007), os elementos Zn e Cu são essenciais na nutrição humana. No entanto, o cobre é amplamente utilizado nos fungicidas aplicados nas oliveiras e é também um metal de transição que, mesmo em pequenas concentrações, é um potente catalisador das reações de oxidação, pelo que os seus resíduos no azeite devem ser controlados de maneira a assegurar a sua qualidade. Verificou-se que todas as amostras de azeite excederam o valor máximo recomendado pelo COI de 0,1 mg/Kg.

Tabela 20 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância relativos aos elementos minerais usados na caracterização dos diferentes bagaços de azeitona (mg/Kg)

	Margem esquerda			Margem direita		
	Sto. Agostinho (Moura)	S. João Baptista (Moura)	Salvador (Serpa)	S.Brissos (Beja)	Santiago Maior (Beja)	Reguengos Monsaraz (Reguengos)
Li	nd	6,90(2,50) ^a	nd	nd	9,10(1,50) ^a	nd
V	0,70(0,10) ^c	0,80(0,00) ^b	1,10(0,00) ^a	1,10(0,00) ^a	0,90(0,10) ^b	0,90(0,10) ^b
Cr	5,20(0,10) ^b	5,40(0,00) ^{ab}	5,70(0,10) ^a	5,10(0,20) ^b	4,00(0,10) ^c	4,20(0,20) ^c
Co	2,60(0,40) ^b	2,60(0,10) ^b	3,30(0,30) ^{ab}	3,60(0,10) ^a	1,50(0,20) ^c	2,60(0,10) ^b
Ni	4,10(0,10) ^c	5,70(0,20) ^b	8,70(0,20) ^a	5,70(0,10) ^b	5,80(0,20) ^b	4,70(0,10) ^c
Cu	100,20(0,20) ^c	141,10(0,90) ^a	50,70(0,20) ^e	116,20(0,60) ^b	49,40(0,70) ^e	85,00(0,30) ^d
Zn	70,60(0,30) ^b	91,70(1,30) ^a	28,10(0,10) ^e	40,30(0,40) ^d	27,00(0,20) ^e	46,20(0,10) ^c
Ga	4,50(0,10) ^e	8,10(0,10) ^c	9,80(0,20) ^b	6,50(0,20) ^d	12,90(0,20) ^a	12,30(0,00) ^a
Sr	12,00(0,10) ^f	43,00(0,30) ^b	50,90(0,20) ^a	19,90(0,20) ^e	22,80(0,20) ^d	37,50(0,30) ^c
Cd	nd	0,60(0,10)	nd	nd	nd	nd
Ba	23,30(0,10) ^e	42,60(0,20) ^c	42,70(0,20) ^d	27,80(0,40) ^d	58,70(0,10) ^a	55,90(0,10) ^b

^{a,b,c, ...} Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para $P < 0,05$, $n = 3$ (teste de Scheffé).

Em relação aos bagaços de azeitona resultantes da extração dos diferentes azeites virgens das duas margens do rio Guadiana, não se conseguiu estabelecer um padrão com a composição do solo, nem um padrão entre si. As diferenças mais significativas entre bagaços foram em relação ao teor de estrôncio (Sr). De uma maneira geral, os

elementos quantificados nos bagaços foram os mesmos que os quantificados nos solos mas em concentrações mais elevadas, o que pode ser explicado pela aplicação de fertilizantes e fungicidas foliares, amplamente usados nos olivais (Beltrán *et al*, 2015) e ainda pelo contacto com superfícies metálicas durante o processamento e o seu armazenamento (Sahan *et al*, 2007). Nesta análise optou-se por não incluir o elemento boro (B), uma vez que os valores determinados foram muitíssimo elevados, na ordem das gramas por quilograma. A oliveira é muito exigente em boro e a sua carência afecta o rendimento da cultura tanto em termos quantitativos como qualitativos (Guerra *et al*, 2008). Este elemento aplica-se muitas vezes em pulverizações foliares, o que justifica os valores encontrados na análise do bagaço. Assim, a utilização da composição elemental dos bagaços de azeitona para a determinação da sua origem geográfica não é muito eficaz, uma vez que a concentração destes elementos está mais relacionada com a adição externa às oliveiras em forma de pulverizações do que com a sua origem geográfica.

Na tentativa de identificar as diferenças nos solos dos olivais implantados nas margens esquerda e direita do rio Guadiana de acordo com a sua origem geográfica em relação à sua composição em elementos vestigiais, foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados da análise efetuada a todas as amostras referentes a 11 atributos, nomeadamente: lítio (Li), boro (B), vanádio (V), crómio (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), estrôncio (Sr) e bário (Ba). Na tabela 21 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 21 Valores próprios e extração dos componentes principais

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	8,83	80,30	8,83	80,30
2	1,53	13,87	10,36	94,17
3	0,46	4,20	10,82	98,37
4	0,14	1,24	10,96	99,62
5	0,04	0,37	11,00	99,99
6	0,00	0,01	11,00	99,99
7	0,00	0,00	11,00	100,00
8	0,00	0,00	11,00	100,00
9	0,00	0,00	11,00	100,00
10	0,00	0,00	11,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 94,2% da variância: 80,3% para o primeiro componente e 13,9% para o segundo. Só estes componentes foram significativos, uma vez que são os que apresentaram maior valor próprio. Estando em análise 11 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 11 atributos são transformados em 11 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 8,8 e o segundo valor próprio 1,5.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 22).

Tabela 22 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Lítio (Li)	-0,88*	0,14
Boro (B)	-0,95*	0,21
Vanádio (V)	-0,98*	0,19
Crômio (Cr)	-0,98*	0,09
Cobalto (Co)	-0,97*	0,15
Níquel (Ni)	-0,96*	0,20
Cobre (Cu)	-0,88*	-0,31
Zinco (Zn)	-0,33	-0,94*
Gálio (Ga)	-0,95*	-0,22
Estrôncio (Sr)	-0,94*	0,28
Bário (Ba)	-0,83*	-0,50

* correlações significativas ($r > 0,7$).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso por todos os elementos (com exceção do Zn) com valor de correlação negativo e o 2º componente principal, CP2, é explicado apenas pelo Zn, também com valor de correlação negativo. Assim, na figura 13 pode observar-se a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

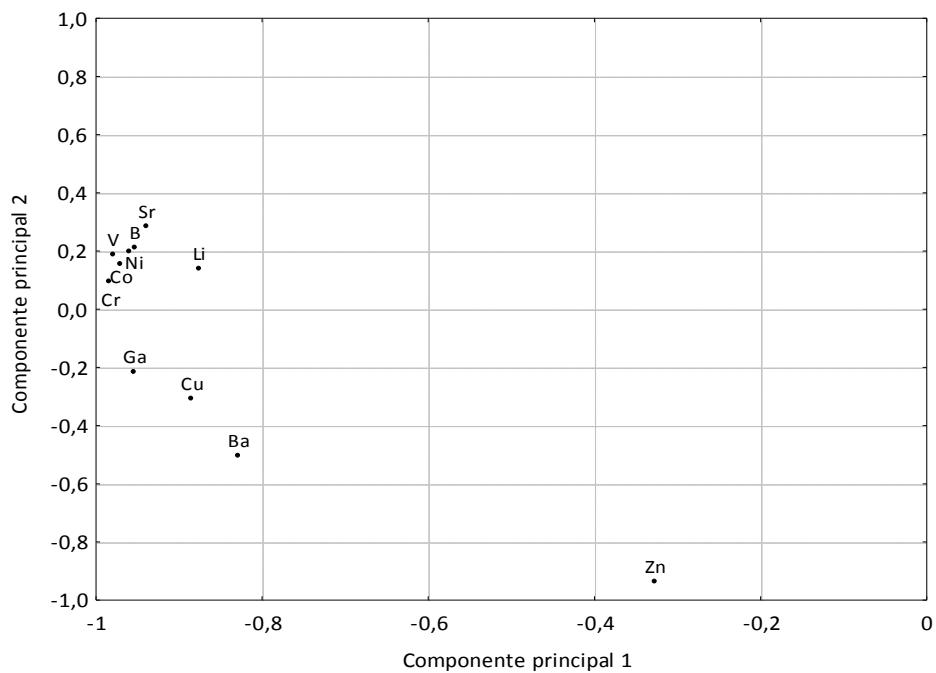


Figura 13 Distribuição dos atributos no plano principal

E na figura 14 pode observar-se a projeção das amostras de solos correspondentes aos olivais situados em seis freguesias das margens esquerda e direita do rio Guadiana no plano principal.

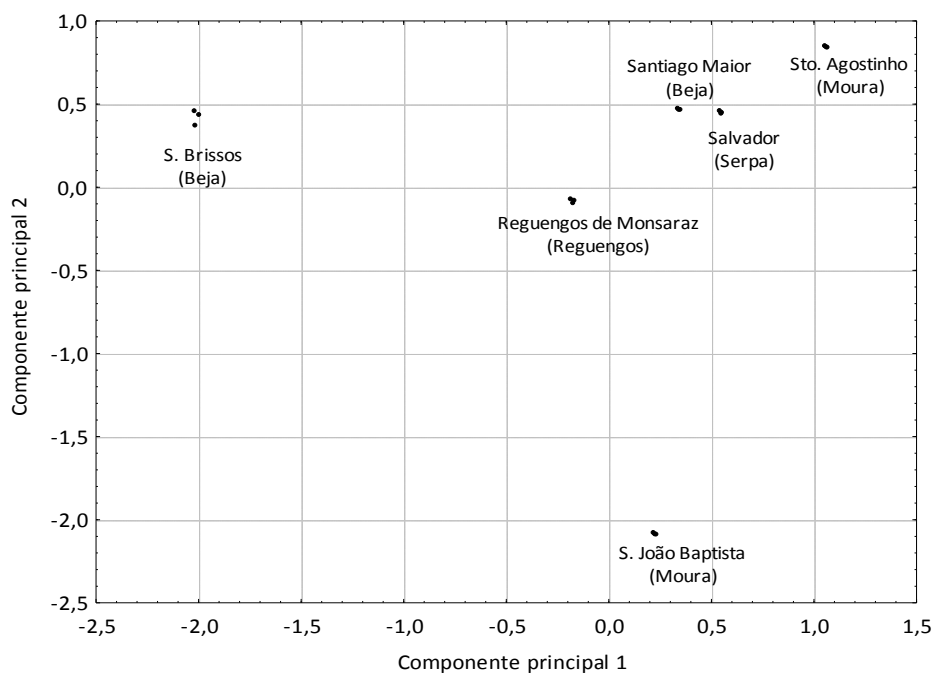


Figura 14 Projeção das amostras de solos dos olivais situados nas seis freguesias no plano principal. Freguesias de S. João Baptista, Sto. Agostinho e Salvador na margem esquerda e freguesias de S. Brissos, Santiago Maior e Reguengos de Monsaraz na margem direita.

De acordo com as figuras 13 e 14, verifica-se uma total separação das amostras de solo por olival, traduzindo a sua diferente composição nos elementos analisados. O solo do olival situado na freguesia de S. João Baptista, no concelho de Moura (margem esquerda) separou-se dos outros principalmente devido ao mais elevado conteúdo de zinco (Zn) e o solo do olival situado na freguesia de S. Brissos, no concelho de Beja (margem direita) separou-se de todos os outros devido ao conteúdo mais elevado na maioria dos elementos químicos (excepto em zinco). As amostras de solo do olival situado na freguesia de sto. Agostinho, concelho de Moura (margem esquerda do rio Guadiana) separaram-se por apresentarem o nível mais baixo de todos os elementos e as amostras de solo correspondentes aos outros olivais terão uma composição elemental intermédia mas distinta entre si.

Na tentativa de verificar se as diferenças na composição elemental dos solos correspondiam também a diferenças na composição elemental dos azeites virgens extraídos das azeitonas colhidas nos olivais implantados nesses solos, foi também utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados das análises químicas efetuadas a todas as amostras de azeite referentes a 10 atributos, nomeadamente: vanádio (V), crómio (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), gálio (Ga), estrôncio (Sr), cádmio (Cd) e bário (Ba). Eliminou-se, nesta análise o elemento lítio (Li) por não ter sido detectado em nenhuma das amostras de azeite virgem analisadas e introduziu-se o cádmio (Cd) que praticamente não foi detetado nas amostras de solos mas surgiu em todas as amostras de azeite virgem analisadas. Na tabela 23 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 23 Valores próprios e extração dos componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	5,63	56,28	5,63	56,28
2	2,51	25,12	8,14	81,40
3	1,34	13,38	9,48	94,78
4	0,33	3,29	9,81	98,06
5	0,15	1,51	9,96	99,57
6	0,03	0,28	9,98	99,85
7	0,01	0,08	9,99	99,94
8	0,00	0,04	10,00	99,98
9	0,00	0,01	10,00	99,99
10	0,00	0,01	10,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 81,4% da variância: 56,3% para o primeiro componente e 25,1% para o segundo. Note-se que apesar de se terem considerado apenas os 2 primeiros componentes, o terceiro também apresentou valor próprio superior a 1. Só estes componentes foram significativos, uma vez que são os que apresentaram maior valor próprio. Estando em análise 10 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 10 atributos são transformados em 10 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 5,6 e o segundo valor próprio 2,5.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 24).

Tabela 24 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
Vanádio (V)	-0,88*	0,07
Crómio (Cr)	-0,79*	-0,45
Cobalto (Co)	-0,03	0,86*
Níquel (Ni)	-0,72*	-0,57
Cobre (Cu)	-0,07	0,90*
Zinco (Zn)	-0,97*	0,14
Gálio (Ga)	-0,92*	-0,01
Estrôncio (Sr)	-0,95*	0,21
Cádmio (Cd)	-0,65	0,59
Bário (Ba)	-0,78*	-0,05

* correlações significativas ($r > 0,7$).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso, pelos elementos vanádio (V), crómio (Cr), níquel (Ni), zinco (Zn), gálio (Ga), estrôncio (Sr) e bário (Ba), todos com valor de correlação negativo. O 2º componente principal, CP2, é explicado pelo cobalto (Co) e pelo cobre (Cu) com valor de correlação positivo. Assim, na figura 15, pode observar-se a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

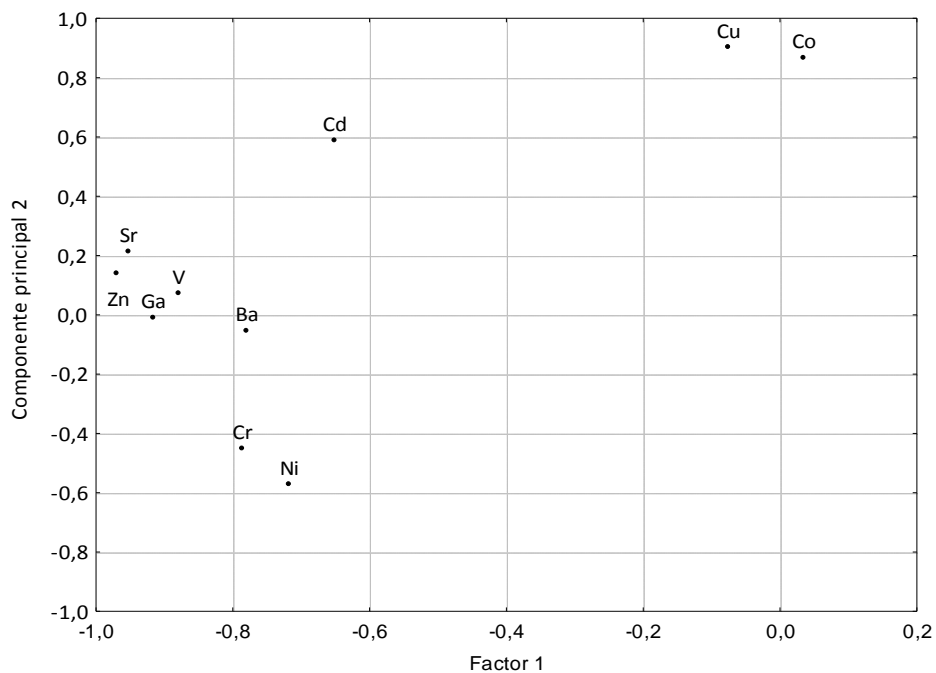
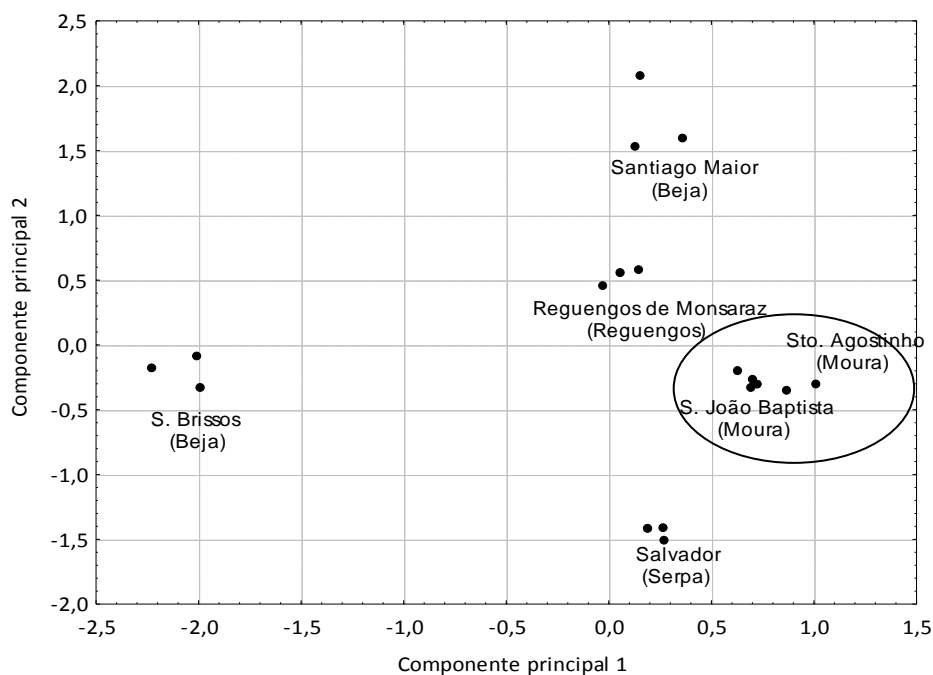


Figura 15 Distribuição dos atributos no plano principal

A seguir, na figura 16 observa-se a projeção das amostras de azeite virgem extraídas das azeitonas produzidas nos olivais situados nas seis freguesias analisadas, no plano principal.



freguesias do concelho de Moura (margem esquerda do rio Guadiana), o que pode ser interessante do ponto de vista da identificação da origem geográfica das amostras. Em um ensaio semelhante realizado por Beltrán *et al* (2015), com diferentes cultivares em diferentes locais não foi possível obter uma separação tão boa quanto a conseguida para os respectivos solos, talvez devido à muito baixa concentração de alguns dos diferentes elementos nos azeites (Llorent-Martinez *et al*, 2011). No presente ensaio, no entanto, conseguiu-se obter uma certa correspondência entre a composição elemental do solo e a do azeite, principalmente em relação às amostras obtidas na freguesia de S. Brissos, concelho de Beja e em relação aos elementos V, Cr, Ni, Ga, Sr e Ba. As amostras de azeite obtidas em Reguengos de Monsaraz apresentaram uma composição semelhante à do respectivo solo, equilibrada nos diferentes elementos analisados. As amostras de azeite virgem obtidas das azeitonas colhidas na freguesia de Santiago Maior, concelho de Beja, separaram-se das restantes pelo seu conteúdo em Cu e Co, tal não tendo acontecido com as amostras dos respectivos solos. O mesmo aconteceu na freguesia de S. João Batista, no concelho de Moura: enquanto os solos neste olival se diferenciaram dos restantes pelo seu elevado conteúdo em zinco (Zn), a mesma tendência não se verificou no respectivo azeite.

De acordo com Llorent-Martinez *et al* (2011), a composição elemental dos azeites depende de vários factores como o solo, o ambiente, genótipo da oliveira, fertilizantes e pesticidas aplicados ou ainda por contaminação através do equipamento de extração. Para verificar a existência de uma relação entre a composição elemental dos solos e a dos azeites, aplicou-se a correlação de Pearson a todas as amostras analisadas (tabela 25).

Tabela 25 Resultados da correlação de Pearson entre a composição elemental do solo e do azeite referente às amostras estudadas (N=18).

		Parâmetros analisados no azeite										
		B	V	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Sr	Cd	Ba
Parâmetros analisados no solo	Li	-0,64*	0,80*	0,63*	0,27	0,56*	0,12	0,79*	0,80*	0,79*	0,56*	0,74*
	B	-0,14	0,82*	0,75*	-0,11	0,69*	-0,07	0,93*	0,96*	0,94*	0,52*	0,85*
	V	-0,32	0,84*	0,68*	0,06	0,61*	0,07	0,95*	0,96*	0,97*	0,62*	0,86*
	Cr	-0,42	0,84*	0,63*	0,14	0,56*	0,03	0,89*	0,97*	0,94*	0,55*	0,91*
	Co	-0,18	0,81*	0,75*	-0,09	0,69*	0,00	0,95*	0,95*	0,95*	0,59*	0,83*
	Ni	-0,33	0,82*	0,78*	0,01	0,70*	0,18	0,98*	0,88*	0,94*	0,74*	0,73*
	Cu	-0,22	0,55*	0,53*	-0,05	0,52*	0,10	0,81*	0,8*	0,78*	0,62*	0,72*
	Zn	-0,17	-0,07	-0,04	-0,01	0,06	-0,18	0,06	0,25	0,05	0,01	0,36
	Ga	-0,45	0,72*	0,52*	0,15	0,49*	-0,09	0,76*	0,94*	0,81*	0,41	0,94*
	Sr	-0,31	0,82*	0,68*	0,07	0,59*	0,24	0,99*	0,89*	0,99*	0,75*	0,74*
	Cd	0,06	0,25	0,27	-0,21	0,34	-0,22	0,46	0,61*	0,46	0,21	0,63*
Ba	-0,53*	0,53*	0,31	0,25	0,31	-0,07	0,56*	0,79*	0,62*	0,32	0,85*	

* Correlações significativas (P<0,05);

Verifica-se que existe uma forte correlação entre a composição elemental dos solos e a dos azeites. Assim, praticamente todos os elementos analisados nos solos se relacionam significativamente com os elementos analisados nas amostras de azeite. As únicas exceções são o zinco (Zn) e o cádmio (Cd). O conteúdo de zinco no solo não está relacionado com qualquer dos elementos analisados no azeite e o cádmio apenas se correlaciona significativamente com o gálio (Ga) e o bário (Ba). Olhando para os azeites analisados, verifica-se que a composição em cobalto (Co) e cobre (Cu), não está relacionada com a composição elemental do solo, para nenhum dos elementos, estando talvez mais relacionada com a aplicação de fertilizantes e fungicidas foliares e/ou com o equipamento de colheita da azeitona e extração do azeite (Benincasa *et al*, 2007; Sahan *et al*, 2007; Llorent-Martinez *et al*, 2011; Nunes *et al*, 2011; Beltrán *et al*, 2015).

5.4 – CONCLUSÕES

O ensaio contribuiu para a rastreabilidade geográfica dos azeites virgem extra elementares, provenientes da cultivar Galega vulgar, a partir do seu perfil em ácidos gordos. Assim concluiu-se que, para esta cultivar, a composição nos principais ácidos gordos é independente do modo de produção do olival, mas muito dependente da

região geográfica de origem. As amostras de azeite provenientes dos concelhos de Viseu e Celorico da Beira, no norte do país, apresentaram um conteúdo em ácido oleico superior aos azeites obtidos no centro e sul e as provenientes dos concelhos de Moura e Beja, no Baixo Alentejo, separaram-se de todas as outras devido ao seu conteúdo mais elevado nos ácidos gordos palmítico e palmitoleico.

Este trabalho é também uma primeira avaliação do potencial dos azeites virgens elementares provenientes da margem esquerda do rio Guadiana a partir de uma caracterização pormenorizada dos parâmetros químicos que os possam avaliar e comprovar a fama lendária que têm tido ao longo dos séculos. O ensaio permitiu concluir que os azeites virgens extraídos da cultivar Galega vulgar na margem esquerda do rio guadiana possuem um conteúdo mais elevado em compostos antioxidantes como compostos fenólicos totais, oleuropeína e hidroxitirol e também em pigmentos clorofilinos, o que lhes confere uma cloração verde mais intensa e um sabor mais amargo e picante, principalmente quando extraídos de azeitonas no estado de maturação verde.

As diretivas europeias indicam que a origem dos azeites virgens deve aparecer claramente no rótulo. Os resultados obtidos neste ensaio mostram que a diferenciação entre azeites com diferentes origens geográficas pode conseguir-se através da utilização de métodos de análise expeditos e simples como o ICP-MS, que permite a rápida determinação de vários elementos presentes nas amostras, mesmo que em quantidades vestigiais. Assim, este método pode ser utilizado para a construção uma base de dados que contribua para a rastreabilidade geográfica dos azeites virgens.

A coincidência na seleção dos elementos para a classificação dos solos (Li, B, V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr e Ba) e dos azeites virgens (V, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Sr, Cd e Ba) de acordo com a sua proveniência geográfica, indicam que alguns elementos presentes nos solos dos olivais são também detetados nos azeites virgens obtidos das oliveiras aí plantadas, embora em concentrações mais baixas. De facto, no presente ensaio, conseguiu-se separar totalmente as amostras de solos de acordo com a freguesia de origem e também se conseguiu uma boa separação dos azeites por freguesia, de acordo com os elementos analisados. Concluiu-se que os azeites virgens obtidos nas

freguesias de S. João Baptista e Sto. Agostinho (freguesias geograficamente próximas) pertencentes ao concelho de Moura, na margem esquerda do rio Guadiana, apresentaram uma composição elemental muito semelhante, o que será muito positivo na determinação da origem geográfica dos azeites. De um modo geral verificou-se também uma relação próxima entre a composição elemental de alguns solos analisados e a dos respectivos azeites; a relação foi particularmente próxima para a freguesia de S. Brissos no concelho de Beja, margem direita do rio Guadiana.

No entanto é necessário, em futuros trabalhos, tentar comprovar estes resultados em outras campanhas, uma vez que a época de colheita da azeitona é um ponto crítico e a composição química de um azeite pode variar consideravelmente de ano para ano. O efeito da maturação no conteúdo em antioxidantes do azeite depende das interações com o ano da colheita, pelo que é necessário estudar o efeito das alterações sazonais em diferentes campanhas.

Os resultados encontrados neste ensaio devem encorajar a região a manter esta herança, protegendo as suas cultivares, divulgando e promovendo as características que diferenciam os seus azeites elementares. A elaboração de um catálogo regional com as características dos seus azeites elementares será, com certeza, uma mais valia em termos turísticos e económicos.

CAPÍTULO 6 – AZEITE VIRGEM BIOLÓGICO VS CONVENCIONAL: VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO AO LONGO DA MATURAÇÃO PARA A CULTIVAR CORDOVIL DE SERPA (ENSAIO 2)

RESUMO

Neste ensaio pretende-se relacionar o azeite extraído de azeitonas obtidas pelo modo de produção biológico com o extraído pelo modo de produção convencional, comparando a sua composição em ácidos gordos e antioxidantes com a composição mineral dos solos. Após seleção dos olivais no concelho de Moura e da cultivar de azeitona, Cordovil de Serpa, foram colhidas, semanalmente, entre os dias 13 de Outubro e 20 de Dezembro de 2011 amostras de azeitonas de oliveiras selecionadas aleatoriamente, acompanhando-se a maturação e extraíndo-se o azeite pelo método Abencor. Após análise de todas as amostras de azeitona e de azeite virgem obtidas, concluiu-se que a evolução da maturação das azeitonas biológicas foi, nestas condições, mais acelerada. As amostras de azeite biológico apresentaram sempre um conteúdo em compostos fenólicos totais consideravelmente mais elevado e também mais elevado em tocoferóis, especialmente em tocoferol γ . As amostras de azeite convencional atingiram uma relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) mais elevada devido ao superior conteúdo em ácido oleico e a um menor teor em ácido linoleico. Observou-se uma relação significativa entre a composição nos ácidos gordos e antioxidantes analisados nas amostras de azeite e a composição mineral dos solos.

Palavras-chave: azeite biológico, Cordovil de Serpa, compostos fenólicos, ácidos gordos, maturação.

6.1 – INTRODUÇÃO

O azeite virgem é considerado a melhor gordura para a alimentação devido às suas características sensoriais, composição química e estabilidade oxidativa. É o único óleo vegetal que pode ser consumido diretamente após a extração e contém elementos nutricionais importantes, entre os quais se encontram os compostos antioxidantes e as vitaminas (Baccouri *et al*, 2008).

A qualidade do azeite é influenciada por um grande número de fatores, entre os quais se encontram a área geográfica de produção (altitude, latitude, composição do solo), a cultivar escolhida, o modo de produção do olival, o período de colheita e método de extração, assim como as condições climáticas durante a campanha (Ben Temime *et al*, 2006).

Durante o amadurecimento das azeitonas ocorrem vários processos metabólicos, com consequentes variações nos perfis de alguns compostos. Estas alterações refletem-se na qualidade, características sensoriais, estabilidade oxidativa e valor nutricional do produto obtido, o que torna importante a determinação do estado de maturação antes da colheita e processamento dos frutos. (Baccouri *et al*, 2007). Yorulmaz *et al* (2013) referem que a percentagem de acidez normalmente aumenta com a maturação devido à atividade das enzimas lipolíticas, enquanto os outros índices básicos de qualidade como o índice de peróxidos e os índices espectrofotométricos (K232 e K270) têm uma evolução variável, pois tanto diminuem como aumentam ou se mantêm constantes para as diferentes cultivares. Os mesmos autores referem que a estabilidade do azeite virgem está relacionada com uma elevada razão ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) e com o seu natural conteúdo em antioxidantes. Uceda *et al* (1998) referem que o meio edafo-climático tem pouca influência na composição qualitativa em ácidos gordos do azeite; tem, no entanto uma clara influência sobre a fração insaponificável, o que se traduz em azeites de diferentes características sensoriais, resultantes, em parte, da variação no conteúdo em compostos fenólicos e tocoferóis na mesma cultivar. A cultivar, pelo contrário, influencia fortemente a composição em ácidos gordos, assim como também o conteúdo em compostos fenólicos e tocoferóis da azeitona.

De acordo com Esmaeili *et al* (2012), durante o amadurecimento da azeitona, a composição química dos frutos altera-se devido à activação e inibição de diferentes actividades enzimáticas, o que afecta também a composição do azeite, modificando o conteúdo relativo dos ácidos gordos. Para Yorulmaz *et al* (2013), a composição em ácidos gordos pode ou não variar com a evolução da maturação, dependendo da capacidade das diferentes cultivares de metabolizar os substratos necessários à síntese dos ácidos gordos relevantes. O tocoferol α , um antioxidante lipossolúvel, responsável pela estabilidade oxidativa, juntamente com os compostos fenólicos, tem um comportamento dependente da cultivar durante a maturação.

Já Hermoso *et al* (1998) concluem que, durante o período de maturação, variável de acordo com as características varietais e com as condições climáticas, existem variações na composição dos frutos e, conseqüentemente nos azeites que originam:

- diminuição da relação de ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados: a composição ácida evolui observando-se uma diminuição na proporção de ácido palmítico e um aumento da percentagem de ácido linoleico, permanecendo praticamente constante a proporção de ácido oleico;
- o conteúdo em compostos fenólicos varia segundo uma curva de segundo grau, com um máximo que geralmente coincide com o momento em que se alcança o máximo de quantidade de azeite no fruto, embora possa corresponder a diferentes estados de maturação para as diversas variedades;
- o conteúdo em tocoferóis diminui consideravelmente ao longo do período de maturação e o conteúdo total de esteróis também tem tendência a diminuir.

Em um ensaio realizado por Baer (2006), com amostras de azeite virgem provenientes das cultivares Galega vulgar (G), Cordovil de Serpa (C) e verdeal alentejana (V) em dois estados de maturação correspondentes à maturação óptima (1) e sobre-maturação (2), observou-se uma evolução no teor relativo dos principais ácidos gordos e na relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) de acordo com o constante na tabela 26.

Tabela 26 Variação percentual (média e desvio padrão) dos principais ácidos gordos e relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) nas amostras de azeite das diferentes cultivares e para os dois estados de maturação

A	Ácido palmítico	Ácido palmitoleico	Ácido esteárico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolénico	AGMI/ AGPI
G1	15,50(0,10)	2,29(0,02)	1,75(0,02)	74,51(0,23)	4,21(0,07)	0,65(0,01)	15,85(0,25)
G2	14,74(0,09)	2,14(0,03)	1,95(0,02)	75,38(0,21)	4,10(0,13)	0,62(0,02)	16,47(0,13)
C1	10,85(0,12)	0,90(0,01)	2,62(0,02)	78,58(0,32)	5,26(0,12)	0,78(0,01)	13,20(0,14)
C2	10,12(0,08)	0,85(0,01)	2,63(0,01)	79,44(0,28)	5,24(0,09)	0,74(0,01)	13,47(0,28)
V1	9,21(0,09)	0,70(0,03)	2,93(0,03)	78,32(0,14)	6,78(0,16)	0,70(0,02)	10,61(0,19)
V2	9,19(0,07)	0,67(0,04)	2,84(0,01)	78,66(0,09)	6,67(0,07)	0,69(0,01)	10,83(0,15)

Considerando o estado de maturação das azeitonas verificou-se, para todas as cultivares, uma diminuição da percentagem de ácido palmítico, sendo essa diminuição tanto maior quanto mais elevado o teor inicial do ácido, uma diminuição dos ácidos gordos polinsaturados, linoleico e linolénico, e um aumento considerável no conteúdo em ácido oleico. Como exposto anteriormente neste trabalho, não existe qualquer concordância entre os vários autores mencionados quanto à evolução dos ácidos gordos com a maturação dos frutos.

Assim, de acordo com estes resultados, a relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) aumentou com o estado de maturação das azeitonas para todas as cultivares, como consequência do aumento do teor de ácido oleico e diminuição simultânea do teor dos ácidos linoleico e linolénico.

Os modos de produção socialmente catalogados como mais amigos do ambiente começaram, em Portugal, formalmente, a ganhar importância em 1994, aquando da entrada em vigor das medidas agro-ambientais (Regulamento CE nº 2078/92). Esta seria uma tentativa oficial de redução do impacto negativo da agricultura, diminuição do abandono das pequenas explorações tradicionais e da perda de importantes valores culturais. Assim, foi nos anos 90 que a agricultura biológica deu os primeiros passos em Portugal, incluindo o olival em modo de produção biológico na região do Alentejo (Pires, 2012).

Na Europa existe actualmente uma consciência crescente, sobretudo dos consumidores e contribuintes, que pretendem, cada vez mais, promover uma agricultura sustentável que produza alimentos saudáveis em respeito pelo meio ambiente e bem estar animal. Como resposta a esta preocupação, a Comissão Europeia introduziu na nova PAC (2014 – 2020) o conceito de “Greening”. A ideia é apoiar financeiramente práticas e actividades que respeitem e promovam o ambiente, como é o caso da agricultura biológica.

A agricultura biológica é um modo de produção que utiliza os recursos naturais de uma forma sustentável e contribui para a segurança e qualidade alimentar, uma vez que não recorre a organismos geneticamente modificados, pesticidas, fertilizantes, promotores de crescimento ou hormonas de síntese (Ferreira, 2010).

Para Ninfali *et al* (2008), a qualidade do azeite virgem pode ser definida com base no seu valor nutricional, características organolépticas, a origem do produto, como por exemplo os produtos DOP, a ausência de contaminantes tóxicos e práticas agronómicas como os modos de produção convencional, integrada e biológica.

Para os autores, a composição do azeite virgem é o resultado de interações complexas entre cultivares, maturação dos frutos, condições pedo-climáticas e modo de condução do olival.

A extração de azeite virgem em agricultura biológica (ou produção biológica de azeite virgem) é diferente da produção convencional ou integrada, pelas práticas agrícolas seguidas no olival, sendo idêntica no processo de extração no lagar. Os princípios e as práticas da agricultura biológica em geral estão definidos na legislação comunitária em vigor, em particular o Regulamento (CE) nº 834/2007, do Conselho, e o Regulamento (CE) nº 889/2008, da Comissão. A produção biológica de azeitona e de azeite enquadra-se nestes regulamentos que abrangem todas as culturas agrícolas e ainda a produção animal.

Os produtos biológicos são geralmente considerados como sendo nutricionalmente melhores. Assim, a crescente necessidade por parte dos consumidores, por produtos alimentares seguros e de qualidade, torna a saúde uma vantagem competitiva do

azeite virgem biológico em relação ao azeite virgem convencional (Sandalidou *et al*, 2002). Em um ensaio realizado por Gutierrez *et al* (1999) com azeites extraídos da cultivar Picual em diferentes estados de maturação, os autores concluíram que as amostras de azeite virgem biológico tinham melhor qualidade intrínseca do que as amostras de azeite convencional: menor percentagem de acidez e índice de peróxidos, maior tempo de indução medido pelo rancimat, mais elevada concentração de tocoferóis, compostos fenólicos totais, o-difenóis e ácido oleico. A qualidade superior do azeite obtido neste modo de produção não é, no entanto, consensual, uma vez que existem outros trabalhos como o de Ninfali *et al* (2008) em Itália com amostras de azeite virgem extraídas das cultivares Leccino e Frantoio, cultivadas na mesma área geográfica em modo de produção biológico e convencional e extraídas com a mesma tecnologia, que conclui não haver diferenças significativas entre o azeite virgem originário de agricultura biológica e o de agricultura convencional.

Para Erel *et al* (2013), apesar de a nutrição mineral dos solos não ser tradicionalmente considerada um factor importante que afecta a qualidade do azeite estudos recentes indicam que os macronutrientes no solo podem ter efeito em alguns compostos do azeite. Em um ensaio de longa duração com azoto, Fernández-Escobar *et al* (2006) reportaram que uma fertilização com elevado nível deste nutriente causou uma diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais. Em outro ensaio, os autores concluíram que quantidades crescentes de azoto, fósforo e potássio resultavam na diminuição dos compostos fenólicos (Fernández-Escobar *et al*, 2009), diminuição da percentagem de ácido oleico e consequente aumento da percentagem de ácido linoleico. O mesmo concluíram Dag *et al* (2009) ao reportar uma diminuição do ácido oleico e compostos fenólicos em resposta a níveis elevados de azoto e fósforo, enquanto que para o potássio, o efeito não foi significativo.

Os diferentes modos de produção do olival, como por exemplo, produção em modo de produção biológico ou convencional, também podem ser importantes na justificação das diferenças obtidas na composição dos azeites analisados, uma vez que implicam diferenças na disponibilidade dos nutrientes existentes no solo para a planta. De facto, Marschner (1995) afirma que a razão mais importante para a divergência de resultados encontrados em relação à nutrição mineral e consequentemente à disponibilidade de

nutrientes para a planta seja o modo como a fertilização é feita e que inclui a composição do fertilizante, o método de aplicação, calendário de aplicação, propriedades físicas e químicas do solo, nível nutricional da árvore e condições ambientais. Em particular a disponibilidade em água é indispensável na determinação da resposta da planta aos minerais.

O objetivo deste ensaio foi investigar a influência da maturação nos parâmetros analíticos que determinam a qualidade de um azeite virgem obtido de azeitonas produzidas em modo de produção biológico em comparação com outro obtido de azeitonas produzidas em modo de produção convencional. A fim de eliminar a influência de outros fatores determinantes da composição do azeite, manteve-se a região geográfica de origem: concelho de Moura, a cultivar: Cordovil de Serpa, o método de extração: extração laboratorial pelo método Abencor e a data de colheita: as azeitonas de ambos os olivais foram colhidas no mesmo dia durante 10 semanas, entre 13 de outubro e 20 de dezembro de 2011. Avaliou-se essencialmente a evolução da composição em antioxidantes e ácidos gordos, devido aos seus benefícios nutricionais e à sua possível utilização como marcadores na rastreabilidade dos azeites de acordo com o seu modo de produção. Paralelamente, colheram-se, na semana 5, amostras de solos em cada um dos olivais estudados, tendo sido analisada a sua composição em relação ao tipo de solo, principais macronutrientes e micronutrientes, pH e percentagem de matéria orgânica, de modo a avaliar uma possível correlação com alguns compostos nos azeites virgens analisados que possibilite uma diferenciação entre azeites virgens biológicos e convencionais, de acordo com a composição mineral dos solos que lhes deram origem.

Uma vez que o objetivo geral do trabalho é a contribuição para a rastreabilidade dos azeites alentejanos optou-se, neste ensaio, pela cultivar Cordovil de Serpa e pelo concelho de Moura, por ser esta cultivar tradicional na região e contribuir com cerca de 40% para a composição do azeite virgem DOP Moura.

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio decorreu na campanha 2011/ 2012 e teve início com a escolha dos olivais e marcação das árvores de onde se recolheram as azeitonas. Marcaram-se aleatoriamente 5 árvores em cada um dos olivais de onde se recolheram, semanalmente, durante dez semanas, com início a 13 de Outubro e conclusão a 20 de Dezembro de 2011, cerca de 3 Kg de frutos que se transportaram imediatamente, em caixas plásticas perfuradas, para o laboratório da Cooperativa Agrícola de Moura e Barrancos. Aqui foi determinado o índice de maturação das azeitonas através da cor, de acordo com o índice de Jaen descrito no capítulo 3 deste trabalho, e procedeu-se no mesmo dia ou, no máximo, no dia seguinte (ficando as azeitonas, neste caso, armazenadas no frigorífico) à extração do azeite pelo método Abencor que corresponde, em laboratório, ao método de extração centrífugo de duas fases. Após extração, cada amostra de azeite virgem foi recolhida em dois frascos de vidro escuro de 200 ml de capacidade e transportadas imediatamente para o laboratório de vinho e azeite do Instituto Politécnico de Beja, onde ficaram armazenadas a -20°C até à data das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

Paralelamente, no dia 15 de Novembro, correspondente à semana cinco do ensaio, foram colhidas três amostras de solo de cada um dos olivais estudados. As amostras foram recolhidas a 30 cm de profundidade e transportadas no mesmo dia em sacos plásticos para o laboratório de análise de terras do Instituto Politécnico de Beja, onde foram limpas e moídas. De cada amostra foram pesados 2 Kg, devidamente codificadas e embaladas individualmente em sacos plásticos e enviadas, através de uma transportadora, em uma caixa de cartão, para um laboratório externo, C + E Analítica, S.L. em Sevilha.

Os dois olivais selecionados são olivais tradicionais de sequeiro localizados no distrito de Beja, concelho de Moura, a cerca de 5 Km de distância um do outro. O olival em modo de produção convencional situa-se na freguesia de S. João Batista e tem uma área de cerca de 100 hectares com 1500 árvores pertencentes à cultivar Cordovil de Serpa. O solo caracteriza-se como solos calcários vermelhos de calcários (Vc) e solos mediterrâneos vermelhos ou amarelos de margas ou calcários margosos (Vcm). O

olival em modo de produção biológico fica na freguesia de Santo Agostinho, tem uma área de 8,5 hectares e 550 oliveiras da cultivar Cordovil de Serpa. O solo caracteriza-se como solos calcários vermelhos de xistos associados a depósitos calcários (Vcx) e solos calcários pardos de xistos associados a depósitos de calcários (Pcx) (SROA, 1966).

O azeite de um dos frascos de cada amostra foi utilizado para a realização das análises efetuadas no Laboratório de Vinho e Azeite do Instituto Politécnico de Beja (LVA): percentagem de acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos a 270 e 232 nm, de acordo com o Regulamento CE nº 2568/ 91 e posteriores alterações e compostos fenólicos totais, de acordo com o método interno deste laboratório descrito no capítulo três do relatório. No laboratório do Centro de Biotecnologia do Alentejo (CEBAL) determinaram-se os compostos fenólicos individuais por HPLC: hidroxitirosol e tirosol, de acordo com o método interno descrito no capítulo três. O segundo frasco de 200 ml de cada amostra foi transportado para o Laboratório de Estudos Técnicos (LET) do Instituto Superior de Agronomia, onde foram realizadas as seguintes análises: ácidos gordos, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2568/ 1991, anexo XA, tocoferóis α , β e γ , de acordo como método interno do Laboratório de Estudos Técnicos do Instituto Superior de Agronomia (LET) e estabilidade oxidativa através do rancimat, como descritos anteriormente neste trabalho. Todos os resultados foram analisados estatisticamente através da análise descritiva e análise de variância e técnicas de análise multivariada de dados como a análise em componentes principais (ACP).

As análises realizadas às amostras de solo pelo Laboratório C + E Analítica foram as seguintes: análise da Textura pelo método de Bouyoucos, percentagem de matéria orgânica pelo método Walkley-Black, pH medido com eléctrodo em extracto aquoso 1:5, azoto Kjeldahl, de acordo com o método Kjeldahl, fósforo e boro por espectrofotometria de Ultravioleta-Visível em extracto 1:10 de Mehlich-3, potássio e sódio por espectrofotometria de emissão atómica em extracto 1:25 de acetato de amónio 1N a pH=7, cálcio e magnésio por espectrofotometria de absorção atómica em extracto 1:25 de acetato de amónio 1N a pH=7, ferro, cobre, zinco e manganês por espectrofotometria de absorção atómica em extracto 1:10 de Mehlich-3.

As amostras analisadas neste ensaio foram codificadas da seguinte maneira:

As letras B e C correspondem ao modo de produção biológico e convencional, respetivamente, e o algarismo a seguir à letra corresponde à semana (data) da colheita. Obtiveram-se assim vinte amostras de azeite virgem, dez de azeite virgem biológico e dez de azeite virgem convencional, armazenadas em 40 frascos de vidro âmbar de 200 ml de capacidade. As amostras B1 e C1 foram colhidas no dia 13 de Outubro, as amostras B2 e C2 no dia 25 de Outubro, as amostras B3 e C3 em 2 de Novembro, as amostras B4 e C4 foram colhidas a 9 de Novembro, as amostras B5 e C5 no dia 15 de Novembro, as amostras B6 e C6 em 23 de Novembro, as amostras B7 e C7 foram colhidas no dia 29 de Novembro, as amostras B8 e C8 foram colhidas a 6 de Dezembro, as amostras B9 e C9 em 12 de Dezembro e as amostras B10 e C10 a 20 de Dezembro de 2011. Obtiveram-se também seis amostras de solos, colhidas no dia 15 de Novembro: três correspondentes ao solo em modo de produção biológico e três correspondentes ao solo em modo de produção convencional que serão codificadas, na apresentação dos resultados, apenas como *biológico* e *convencional*, uma vez que se utilizarão os valores médios e desvios-padrão das 3 determinações de cada elemento para caracterizar a composição mineral dos dois solos.

6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à importância desta cultivar na composição dos azeites virgens alentejanos e na necessidade de aumentar o conhecimento existente acerca do conteúdo em antioxidantes naturais e perfil de ácidos gordos, o delineamento deste ensaio debruça-se, essencialmente, na análise das alterações na composição em antioxidantes e no perfil de ácidos gordos dos azeites virgens extraídos durante o amadurecimento dos frutos e a sua relação com a composição mineral dos respectivos solos conduzidos em modo de produção biológico e convencional.

Assim, neste capítulo, faz-se inicialmente uma apreciação da evolução da maturação das azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa nos dois modos de produção, biológico e

convencional, através da determinação da cor (índice de Jaen) dos frutos colhidos semanalmente nas 10 semanas em que decorreu o ensaio no campo.

De seguida, caracterizam-se quimicamente as amostras de azeite extraídas, analisando-se a evolução da sua composição ao longo do processo de maturação e comparando, para cada parâmetro analisado, os azeites obtidos em modo de produção biológico com os obtidos em modo de produção convencional. Os resultados das médias das três repetições de cada análise são apresentados sob a forma de figuras e/ ou tabelas.

Uma vez que cada amostra de azeite foi caracterizada por vários parâmetros de qualidade e de composição, o estudo de um parâmetro isoladamente não permite avaliar as modificações ocorridas simultaneamente em todas as variáveis analisadas para os dois modos de produção e diferentes datas de colheita. Assim, após a análise estatística descritiva através da determinação da média, desvio e erro padrão, bem como do intervalo de confiança da média a 95% e a análise de variância a um fator (teste de Scheffé para a comparação de médias), houve necessidade de recorrer a técnicas de análise multivariada de dados, nomeadamente à Análise em Componentes Principais (ACP). Os valores médios foram obtidos a partir de três réplicas laboratoriais de cada parâmetro analisado ($n = 3$).

Finalmente, após análise mineral e de textura dos dois solos, aplicou-se o teste da correlação de Pearson para verificar a relação entre os minerais analisados e a composição em antioxidantes (compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, tirosol, tocoferol α , tocoferol β e tocoferol γ) e os principais ácidos gordos (palmítico, oleico e linoleico) dos respectivos azeites virgens. O valor médio de cada elemento do solo analisado foi obtido através da análise de três amostras de cada solo.

6.3.1 – Determinação da cor das azeitonas (índice de Jaen) ao longo da maturação

Na tabela 27 apresentam-se os resultados obtidos na determinação do estado de maturação das azeitonas colhidas durante 10 semanas, entre os dias 13 de Outubro e 20 de Dezembro de 2011, através do índice de Jaen.

Tabela 27 Índices de maturação das azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa produzidas nos modos de produção biológico e convencional, de acordo com as datas de colheita

Data da colheita	Amostra	Índice de maturação
13 de Outubro	B1	0,70
	C1	0,04
25 de Outubro	B2	2,18
	C2	0,96
2 de Novembro	B3	3,08
	C3	1,40
9 de Novembro	B4	2,96
	C4	2,04
15 de Novembro	B5	3,52
	C5	1,96
23 de Novembro	B6	3,22
	C6	2,35
29 de Novembro	B7	3,94
	C7	2,94
6 de Dezembro	B8	4,08
	C8	3,32
12 de Dezembro	B9	5,26
	C9	3,50
20 de Dezembro	B10	5,72
	C10	4,58

As letras B e C representam, respetivamente, as azeitonas colhidas em modo de produção biológico (B) e em modo de produção convencional (C) e o algarismo seguinte, de 1 a 10, representa a semana da colheita, correspondente à data referida na primeira coluna da tabela. De acordo com o referido no capítulo 3, o índice de Jaen baseia-se na cor da pele e da polpa dos frutos para determinar o índice de maturação das azeitonas, atribuindo o valor mínimo de zero (0) às azeitonas de cor verde intensa e o valor máximo de 7 às azeitonas com a pele e a polpa totalmente negras.

De acordo com os valores determinados verifica-se que as azeitonas em modo de produção biológico tiveram uma evolução da maturação muito mais acelerada do que as azeitonas produzidas em modo de produção convencional, medida através da coloração da pele e polpa dos frutos. Mais à frente neste trabalho, após a análise química de todas as amostras de azeite extraídas destas azeitonas, verificar-se-á se a diferença na evolução da cor das azeitonas terá correspondência com a evolução da composição em antioxidantes e perfil ácido, o que permitiria estabelecer, por exemplo, uma relação de fácil percepção visual entre a cor dos frutos e o teor em compostos fenólicos do azeite correspondente.

Para as azeitonas em modo de produção biológico, o índice de maturação de Jaen variou entre o valor 0,70 que corresponde a frutos de cor verde ligeiramente amarelada e o valor de 5,72 que corresponde a um estado de maturação já muito avançado com os frutos de pele totalmente negra e a polpa roxa em mais de 50%. Nas azeitonas em modo de produção convencional, o índice de Jaen variou entre o valor mínimo de 0,04 que corresponde a frutos de cor verde intensa e o valor de 4,52, frutos com a pele negra e polpa branca já a começar a ficar arroxeadas.

Na figura 17 pode observar-se graficamente a evolução da maturação das azeitonas colhidas nas datas determinadas. O índice de maturação aumentou ao longo das semanas de modo semelhante para ambos os modos de produção, embora a evolução tenha sido um pouco mais irregular para as azeitonas biológicas. Nestas amostras o valor do índice de maturação foi constantemente mais elevado para todas as datas analisadas.

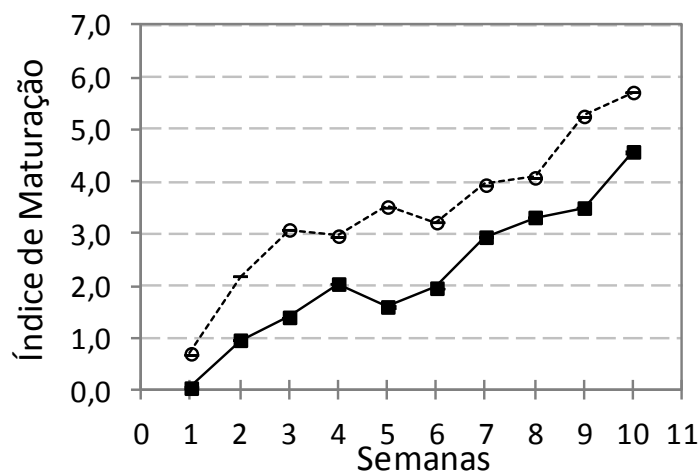


Figura 17 Evolução do índice de maturação (índice de Jaen) para as azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa, produzidas em modo de produção biológico (○) e em modo de produção convencional (■) durante 10 semanas, entre os dias 13 de Outubro e 20 de Dezembro de 2011)

6.3.2 – Caracterização química das amostras de azeite virgem

Em data determinada procedeu-se à análise química das 20 amostras de azeite virgem armazenadas a -20°C em frascos de vidro âmbar de 200 ml de capacidade. Inicialmente determinaram-se os índices gerais de qualidade para todas as amostras: percentagem de acidez (%), índice de peróxidos ($\text{meq.O}_2/\text{Kg}$ de azeite) e índices espectrofotométricos (k232 e K270), o que permitiu classificá-las nas categorias de azeite virgem extra ou azeite virgem, de acordo com os resultados obtidos. Analisou-se também a evolução da composição em antioxidantes naturais: compostos fenólicos totais (mg/Kg), tirosol (mg/Kg), hidroxitirosol (mg/Kg) e tocoferóis α , β e γ (mg/Kg) e do perfil em ácidos gordos (%). Finalmente mediu-se a estabilidade oxidativa das amostras através do rancimat (h) e calculou-se a relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI).

Na tabela 28 apresentam-se os valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para as determinações químicas efetuadas às amostras de azeite.

Tabela 28 Caracterização da evolução química (média e desvio-padrão) das amostras de azeite virgem biológico e convencional ao longo da maturação da cultivar Cordovil de Serpa

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
acidez (%)	0,24 ^{fg} (0,02)	0,30 ^{ef} (0,01)	0,31 ^{ef} (0,02)	0,42 ^{cd} (0,01)	0,44 ^c (0,01)	0,33 ^e (0,02)	0,32 ^e (0,01)	0,62 ^b (0,02)	0,99 ^a (0,04)	0,96 ^a (0,01)	0,22 ^g (0,02)	0,34 ^{de} (0,02)	0,31 ^{ef} (0,01)	0,26 ^{efg} (0,01)	0,28 ^{efg} (0,01)	0,34 ^{de} (0,01)	0,34 ^{de} (0,02)	0,33 ^e (0,02)	0,48 ^c (0,01)	0,47 ^c (0,02)
IP	5,53 ^{cd} (0,06)	6,20 ^{abc} (0,10)	6,37 ^{ab} (0,15)	3,43 ^{hij} (0,21)	4,50 ^{ef} (0,10)	5,63 ^{bcd} (0,15)	4,23 ^{eh} (0,25)	4,30 ^{efg} (0,10)	6,87 ^a (0,06)	6,27 ^{abc} (0,21)	5,70 ^{bc} (0,10)	4,47 ^{ef} (0,25)	3,97 ^{fj} (0,15)	3,53 ^{g(i)} (0,15)	3,33 ^{ij} (0,23)	4,07 ^{e(i)} (0,21)	3,27 ^j (0,21)	4,83 ^{de} (0,06)	3,30 ^j (0,10)	4,13 ^{e-i} (0,23)
k270	0,156 ^d (0,002)	0,133 ^{gh} (0,001)	0,187 ^a (0,002)	0,129 ^h (0,001)	0,149 ^{de} (0,001)	0,188 ^a (0,002)	0,156 ^d (0,003)	0,177 ^b (0,001)	0,167 ^c (0,003)	0,165 ^c (0,002)	0,154 ^d (0,001)	0,131 ^h (0,002)	0,113 ⁱ (0,002)	0,142 ^{ef} (0,002)	0,130 ^h (0,001)	0,145 ^{ef} (0,002)	0,139 ^{fg} (0,001)	0,115 ⁱ (0,002)	0,111 ⁱ (0,001)	0,146 ^{ef} (0,002)
k232	1,714 ^g (0,001)	1,937 ^a (0,002)	1,881 ^b (0,001)	1,531 ⁿ (0,001)	1,606 ^f (0,001)	1,786 ^e (0,002)	1,829 ^d (0,002)	1,826 ^d (0,001)	1,749 ^f (0,002)	1,844 ^c (0,003)	1,625 ^k (0,001)	1,666 ^f (0,001)	1,493 ^o (0,001)	1,676 ^h (0,002)	1,406 ^d (0,002)	1,555 ^m (0,003)	1,552 ^m (0,002)	1,537 ⁿ (0,003)	1,465 ^p (0,002)	1,651 ^l (0,001)
PoilT (mg/Kg)	304,4 ^e (1,5)	338,6 ^d (1,1)	353,4 ^c (1,7)	392,7 ^a (2,4)	382,6 ^b (1,5)	312,3 ^e (2,3)	233,3 ^{hi} (1,7)	264,8 ^f (3,4)	250,0 ^g (1,9)	210,8 ⁱ (0,9)	184,9 ^j (0,4)	186,6 ^f (1,4)	208,6 ^f (0,6)	238,6 ^h (1,5)	227,1 ⁱ (0,9)	230,0 ^j (1,3)	234,7 ^{hi} (0,9)	196,3 ^k (3,4)	190,5 ^{kl} (0,9)	186,3 ^l (1,2)
Tirosol (mg/Kg)	2,53 ^{gh} (0,06)	4,80 ^{ab} (0,10)	4,97 ^a (0,06)	5,03 ^a (0,21)	4,67 ^{abc} (0,21)	4,17 ^{bcd} (0,12)	3,97 ^{cd} (0,15)	3,70 ^{de} (0,20)	2,73 ^{fg} (0,15)	3,00 ^{ef} (0,10)	1,13 ^{kl} (0,06)	1,27 ^{kl} (0,15)	1,10 ^l (0,17)	1,83 ^{m-k} (0,21)	1,73 ^l (0,06)	2,40 ^{f-i} (0,10)	2,87 ^{fg} (0,06)	2,17 ^{ghi} (0,21)	1,97 ^{hij} (0,12)	3,10 ^{ef} (0,20)
Hidroxi (mg/Kg)	0,47 ^{eh} (0,06)	0,77 ^{d-g} (0,06)	0,83 ^{c-f} (0,12)	0,93 ^{b-e} (0,15)	1,13 ^{a-d} (0,06)	1,30 ^{abc} (0,10)	1,43 ^{ab} (0,06)	1,47 ^a (0,15)	1,13 ^{a-d} (0,15)	0,57 ^{eh} (0,12)	0,30 ^{gh} (0,10)	0,23 ^h (0,06)	0,33 ^{fgh} (0,15)	0,37 ^{fgh} (0,06)	0,53 ^{eh} (0,15)	0,57 ^{eh} (0,06)	0,40 ^{fgh} (0,00)	0,60 ^{eh} (0,10)	0,47 ^{eh} (0,12)	0,27 ^{gh} (0,06)
Tocof α (mg/Kg)	434,5 ^a (0,45)	390,6 ^b (0,27)	293,6 ^{efg} (0,45)	312,5 ^d (0,16)	289,6 ^{fg} (0,58)	309,4 ^d (0,21)	293,5 ^{efg} (0,35)	304,2 ^{de} (0,38)	280,60 ^h (4,30)	261,4 ⁱ (0,30)	342,7 ^c (0,41)	300,3 ^{def} (0,95)	273,1 ^{hi} (0,20)	273,3 ^{hi} (0,80)	242,7 ^j (10,44)	263,9 ⁱ (1,31)	274,3 ^{hi} (1,12)	265,0 ^k (0,94)	223,2 ^k (5,59)	200,4 ^l (0,90)
Tocof β (mg/Kg)	3,96 ^a (0,15)	3,33 ^{bc} (0,21)	2,83 ^{d-g} (0,12)	2,05 ^{klm} (0,03)	2,51 ^{f-j} (0,03)	2,40 ^{g-l} (0,08)	2,67 ^{eh} (0,05)	2,47 ^{f-k} (0,03)	2,19 ^{lm} (0,07)	2,10 ^{lm} (0,05)	3,37 ^{bc} (0,04)	3,14 ^{cd} (0,04)	3,61 ^{ab} (0,04)	2,98 ^{cde} (0,02)	2,96 ^{cde} (0,11)	2,28 ^{lm} (0,06)	2,54 ^{e-i} (0,21)	2,86 ^{def} (0,05)	1,89 ^m (0,03)	1,98 ^{lm} (0,05)
Tocof γ (mg/Kg)	12,78 ^a (0,38)	12,74 ^a (0,14)	13,03 ^a (0,04)	13,25 ^a (0,08)	5,48 ^f (0,01)	7,07 ^d (0,05)	8,09 ^c (0,06)	8,33 ^c (0,19)	6,56 ^e (0,26)	7,28 ^d (0,16)	9,20 ^b (0,12)	7,33 ^d (0,11)	4,50 ^{gh} (0,06)	3,39 ⁱ (0,03)	4,26 ^h (0,17)	4,93 ^{fg} (0,05)	3,08 ^l (0,06)	2,27 ^j (0,06)	2,89 ^{ij} (0,10)	3,42 ⁱ (0,08)
Ranc (h)	27,1 ^{c-f} (0,4)	27,9 ^{a-d} (0,4)	28,8 ^{abc} (0,2)	29,3 ^{ab} (0,2)	21,8 ^g (0,9)	24,2 ^{hi} (0,3)	25,6 ^{fgh} (0,3)	27,2 ^{c-f} (0,3)	29,7 ^a (0,2)	29,3 ^{ab} (0,3)	25,0 ^{ghi} (0,3)	25,6 ^{fgh} (0,3)	26,4 ^{d-g} (0,7)	27,5 ^{b-e} (0,6)	24,5 ^{hi} (0,2)	25,2 ^{gh} (0,4)	25,9 ^{eh} (0,2)	25,0 ^{ghi} (0,3)	23,3 ^{ij} (0,4)	25,5 ^{fgh} (0,3)

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé)

Determinações: percentagem de acidez - acidez (%); índice de peróxidos (meq.O₂/Kg) – IP; índices espectofotométricos- K270 e K232; ccompostos fenólicos totais (mg/Kg) – C.Fenol T; tirosol (mg/Kg) ; hidroxitirosol (mg/Kg)- Hidroxi; tocoferóis α, β e γ (mg/ Kg) – Tocof α, Tocof β, Tocof γ, rancimat (h) – Ranc.

De acordo com os resultados expostos na tabela 28 verifica-se que a percentagem de acidez das amostras de azeite extraído aumentou ao longo da maturação, o que está de acordo com Yorulmaz (2013), que referem que este aumento se deve à ativação das enzimas lipolíticas. De facto, este valor aumentou consideravelmente nas últimas três semanas nos azeites obtidos no modo de produção biológico, tendo como consequência a diminuição da classificação de azeite virgem extra para a categoria de azeite virgem no final do ensaio. Os azeites provenientes das azeitonas cultivadas em modo de produção convencional mantiveram uma acidez baixa ao longo de todo o ensaio, embora tenha havido uma ligeira subida. Provavelmente esta diferença em relação aos dois modos de produção deve-se ao facto de as azeitonas biológicas terem atingido um índice de maturação muito elevado no final do ensaio, havendo já uma atividade lipolítica muito elevada.

Na figura 18 pode observar-se o aumento da percentagem de acidez do azeite durante as últimas semanas de maturação das azeitonas, principalmente em modo de produção biológico.

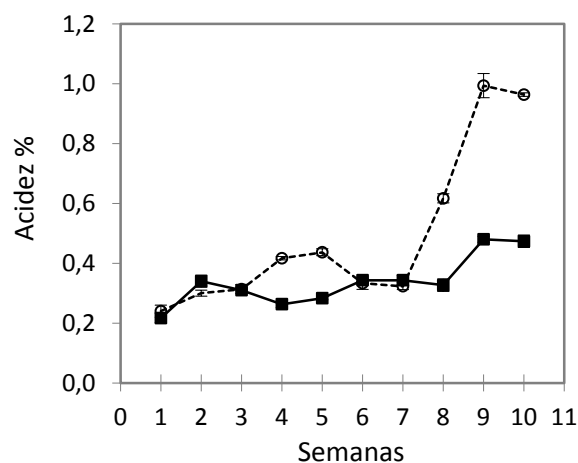


Figura 18 Variação da percentagem de acidez (%) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

O gráfico mostra que, até à sétima semana de ensaio (29 de Novembro), não houve uma evolução significativa da percentagem de acidez, tendo havido uma subida muito acentuada em Dezembro, para o azeite biológico, provavelmente devido ao mais avançado estado de maturação das azeitonas que lhe deram origem.

Em relação ao índice de peróxidos (IP) e índices espectrofotométricos (K270 e K232), o azeite biológico apresentou também valores ligeiramente superiores aos do azeite convencional, como se pode observar nas figuras 19 e 20.

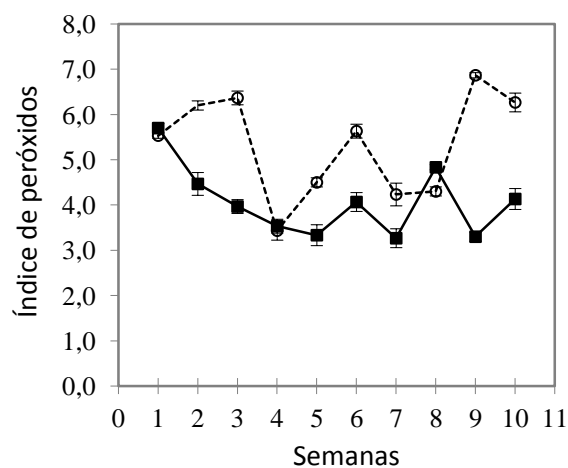


Figura 19 Variação do índice de peróxidos com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

Também em relação ao índice de peróxidos o azeite biológico apresentou valores quase sempre superiores aos dos azeites convencionais, embora sejam baixos em relação ao limite máximo legal de 20 meq.O₂/ Kg de azeite para as categorias de azeite virgem extra e virgem. Este valor não apresentou uma evolução clara durante a maturação, embora haja uma descida no início da maturação, o que está de acordo com Yorulmaz (2013) que refere que o índice de peróxidos e os índices espectrofotométricos (K270 e K232), tanto podem baixar como subir ou manter-se constantes para as várias cultivares durante a maturação.

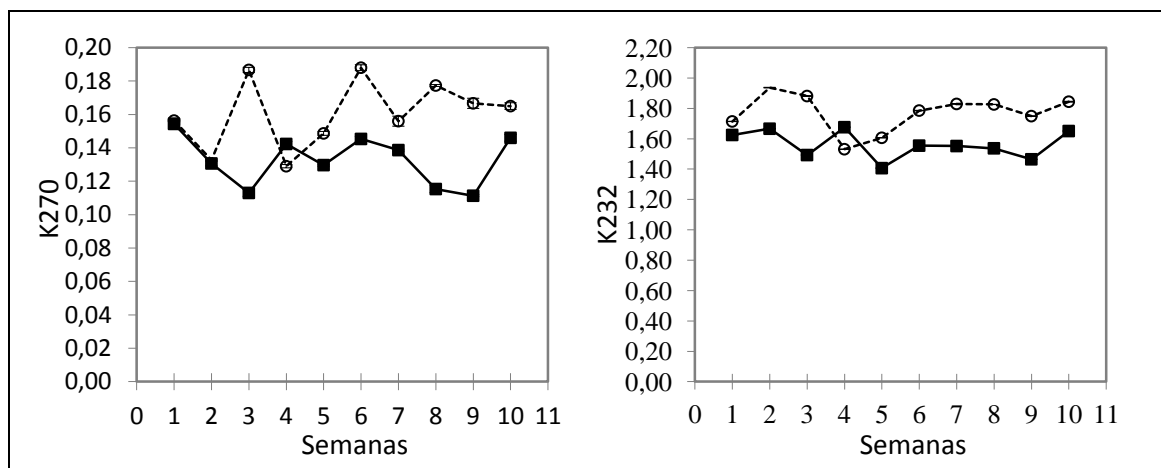


Figura 20 Variação dos índices espectrofotométricos (K270 e k232) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

Também os índices espectrofotométricos foram quase sempre ligeiramente superiores nas amostras de azeite biológico não tendo, no entanto, em nenhuma das amostras, ultrapassado os limites estipulados para a categoria virgem extra.

Os compostos fenólicos são compostos importantes naturalmente presentes no azeite, não só devido à sua capacidade antioxidante mas também devido ao seu interesse nutricional e sensorial: têm atividade citostática o que indica a sua potencial atividade como compostos anti-cancerígenos; protegem as proteínas de baixa densidade da oxidação e protegem o azeite da auto-oxidação. Além disso são responsáveis pelo atributo amargo do azeite (Beltrán *et al*, 2005).

Em relação aos azeites analisados, verifica-se que as amostras de azeite virgem biológico apresentam um teor consideravelmente mais elevado em compostos fenólicos totais, do que as amostras de azeite convencional. O azeite biológico apresentou um máximo de 392,7 mg/ Kg, correspondente à quarta semana de ensaio (9 de Novembro) e um mínimo de 210,8 mg/ Kg, correspondente à última semana de ensaio. O azeite virgem convencional conseguiu um valor máximo de 238,6 mg/ Kg, também na quarta semana de ensaio e um valor mínimo de 184,9 mg/ Kg na primeira semana da colheita (13 de Outubro). De acordo com Rotondi *et al* (2004), o teor de compostos fenólicos aumenta progressivamente até um limite máximo correspondente até um nível de coloração médio na escala do índice de Jaen,

descendo depois abruptamente com a evolução da maturação. Já Beltrán *et al* (2005) refere que o conteúdo em compostos fenólicos diminui com a maturação.

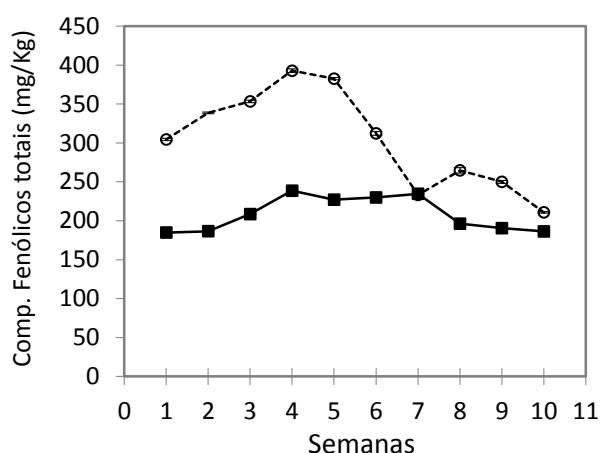


Figura 21 Variação do teor de compostos fenólicos totais com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

Como se pode verificar na figura 21, o azeite biológico apresenta um teor de compostos fenólicos totais bastante superior ao azeite convencional, aumentando o seu valor até à quarta data de análise e depois descendo abruptamente. No azeite convencional não se verificou um aumento tão grande nem uma descida tão acentuada do conteúdo de compostos fenólicos totais. De realçar o facto de ambos os azeites terem atingido o teor máximo de compostos fenólicos totais na mesma data (9 de novembro), apesar de apresentarem índices de maturação diferentes (2,96) para a azeitona biológica e 2,04 para a convencional). Esta evidência poderá confirmar as observações feitas por Oueslati *et al* (2009), que, ao contrário de Rotondi *et al* (2004), referem não ter encontrado uma relação clara entre o conteúdo em compostos fenólicos totais e o índice de maturação dos frutos (índice de Jaen). Assim, o autor conclui que este resultado poderá estar relacionado com o facto de as azeitonas de dois estados de maturação diferentes terem sido colhidas no mesmo dia, devendo ser a redução no conteúdo em compostos fenólicos atribuída ao período de colheita e não à cor da pele dos frutos. A degradação enzimática e oxidativa dos compostos fenólicos na azeitona aumenta com o avanço do período de colheita como consequência provável da senescência dos frutos.

A determinação do teor dos compostos fenólicos individuais, tirosol e hidroxitirosol, mostrou também valores superiores nas amostras de azeite biológico em relação ao azeite convencional. Estes compostos antioxidantes são importantes porque estão relacionados com a saúde e com a estabilidade do azeite. Os compostos fenólicos ativos no azeite virgem são principalmente orto-difenóis como o hidroxitirosol e as suas formas oleosídicas e o ácido cafeico. O monofenol tirosol e os seus derivados oleosídicos, mostram menor atividade antioxidante (Aparicio *et al*, 1999). Ouni *et al* (2011) concluíram que os dois principais fenóis simples existentes em amostras de azeite virgem extraídas da cultivar oueslati, na Túnisia, são o hidroxitirosol e o tirosol, sendo o teor de hidroxitirosol geralmente, mas não sempre, superior ao de tirosol. O autor e Yorulmaz *et al* (2013) justificam estes resultados afirmando que os dois fenóis podem ser produzidos através da hidrólise parcial de compostos como a oleuropeína, por ex^o. Além disso, a elevada atividade antioxidante do hidroxitirosol, muito mais elevada que a do tirosol, favorece a sua degradação e desaparecimento.

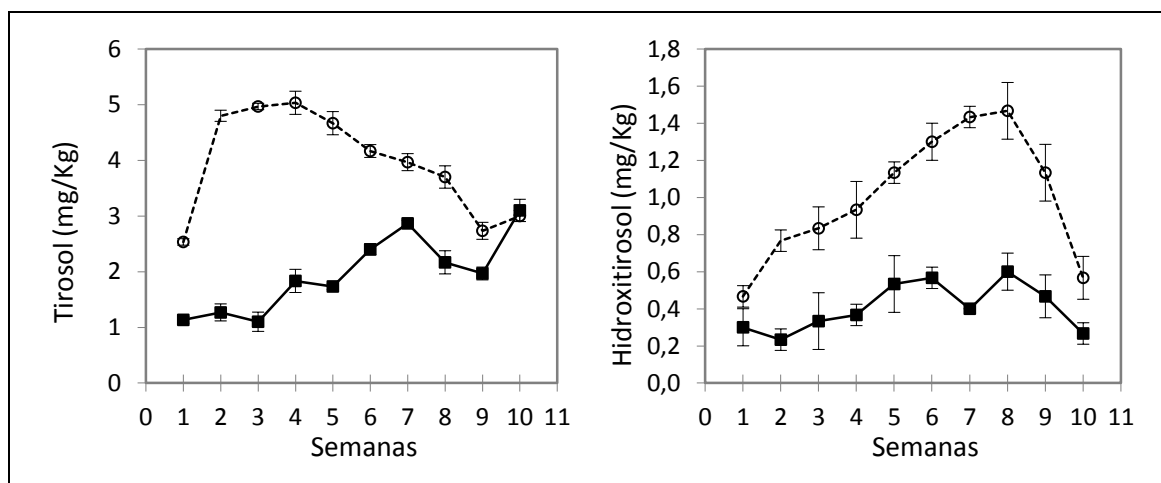


Figura 22 Variação do teor de compostos fenólicos individuais (tirosol e hidroxitirosol) com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

No presente ensaio obtiveram-se teores superiores de tirosol em relação ao conteúdo em hidroxitirosol em todas as amostras analisadas, o que não é totalmente concordante com Ouni *et al* (2011), mas de acordo com a maioria dos autores consultados (ver ponto 2.2 deste trabalho). Verifica-se que os valores encontrados na bibliografia são muito variados, podendo considerar-se baixos os valores determinados neste ensaio para os dois compostos, tirosol e hidroxitirosol. A evolução no conteúdo

em tirosol foi muito diferente para os dois azeites. Enquanto que para o azeite biológico houve uma subida inicial do teor e depois uma descida progressiva ao longo da maturação, para o azeite convencional a tendência foi para uma subida ao longo da maturação. Em relação ao hidroxitirosol, a tendência foi para uma subida até uma determinada etapa da maturação, tanto para o azeite biológico como para o convencional, e depois uma descida que, no caso do azeite biológico, foi bastante acentuada. Esta descida abrupta do teor de hidroxitirosol nas últimas semanas do ensaio coincide com o aumento da percentagem de acidez, confirmando o adiantado estado de maturação das azeitonas biológicas, havendo já alguma degradação do azeite contido nos frutos. Baccouri *et al* (2008) referem um aumento dos teores em compostos fenólicos simples (tirosol e hidroxitirosol) nos azeites obtidos durante a maturação de azeitonas da cultivar chétoui, que o autor atribui à decomposição de compostos fenólicos complexos através da atividade de enzimas hidrolíticas.

Quando comparado com os valores de hidroxitirosol (mg/ Kg) reportados anteriormente por outros autores para diferentes cultivares provenientes de países mediterrânicos como: 0,3 – 46,3 (Dabbou *et al*, 2011), 1,0 – 13,2 (Taamalli *et al*, 2012), 3,8 – 7,1 (Ouni *et al*, 2011), 5,7 – 38,9 (Garcia *et al*, 2002) e 1,3 – 2,1 (Arslan *et al*, 2013), verifica-se que os valores determinados nos azeites provenientes da cultivar Cordovil de Serpa, nos dois modos de produção, são semelhantes embora baixos.

O azeite biológico atingiu um máximo de tirosol de 5,03 ppm ou mg/Kg e um mínimo de 2,53 ppm ou mg/ Kg. O azeite convencional atingiu um máximo de 3,10 ppm ou mg/Kg e um mínimo de 1,10 mg /Kg. O hidroxitirosol conseguiu um máximo de 1,47 ppm ou mg/Kg na oitava semana (6 de Dezembro) e um mínimo de 0,47 ppm na primeira semana no azeite biológico e um máximo de 0,60 ppm também na oitava semana e um valor mínimo de 0,23 ppm na 2ª semana. Também para o hidroxitirosol se verificou o mesmo que para os compostos fenólicos totais: ambos os azeites atingiram o valor máximo na mesma data, 8 de Dezembro (e que não coincide com a data correspondente ao valor máximo de compostos fenólicos totais), o que reforça a ideia de que a evolução do teor destes compostos estará mais relacionada com a data do que com a cor dos frutos medida pelo índice de maturação de Jaen.

No azeite virgem a vitamina E é representada pelos tocoferóis, compostos com atividade antioxidante que, entre outros benefícios nutricionais, inibem a oxidação das lipo-proteínas de baixa densidade (Beltrán *et al*, 2005). A importância destes compostos é suportada pela evidência do seu papel tanto na qualidade e autenticidade do azeite virgem como na sua contribuição para a saúde (Escuderos *et al*, 2009). A distribuição dos tocoferóis no azeite inclui, essencialmente, os tocoferóis α , β e γ , sendo o tocoferol α o principal, contabilizando cerca de 95% do total dos tocoferóis.

A maior parte dos autores consultados afirma que o comportamento da evolução do teor de tocoferóis é muito variável e dependente da cultivar de onde se extrai o azeite (Yorulmaz *et al*, 2013). Assim, e de acordo com Baccouri *et al* (2008), enquanto que para o azeite extraído da cultivar Chemlali, o teor de tocoferol α , se mantém praticamente constante até atingir o grau de maturação 3,5 do índice de Jaen e depois diminui acentuadamente, para o azeite extraído da cultivar Chétoui observa-se uma descida ligeira ao longo de todo o amadurecimento das azeitonas. Os mesmos autores referem que os tocoferóis β e γ não evidenciaram qualquer padrão de comportamento durante a maturação dos frutos.

Como se pode observar na figura 23 obtiveram-se valores mais elevados de tocoferol α e principalmente de tocoferol γ nas amostras de azeite biológico. Em relação ao teor de tocoferol β , não se observaram diferenças muito significativas entre as amostras de azeite biológico e de azeite convencional, ao longo da maturação (ver tabela 28). A evolução do conteúdo em tocoferol α durante o amadurecimento dos frutos mostrou uma tendência para diminuir ao longo do processo, embora a diminuição tenha sido mais acentuada no início e no final da maturação. O comportamento dos tocoferóis β e γ mostrou flutuações ao longo do período em análise, com descidas e subidas durante o amadurecimento. Ao analisar a bibliografia consultada (ponto 2.2), podemos ainda concluir que o azeite virgem extraído da cultivar Cordovil de Serpa, principalmente o biológico, é um azeite com um conteúdo elevado em tocoferóis, principalmente α e γ , em especial no início do amadurecimento, 434,5 mg/Kg e 13,25 mg/Kg, respectivamente.

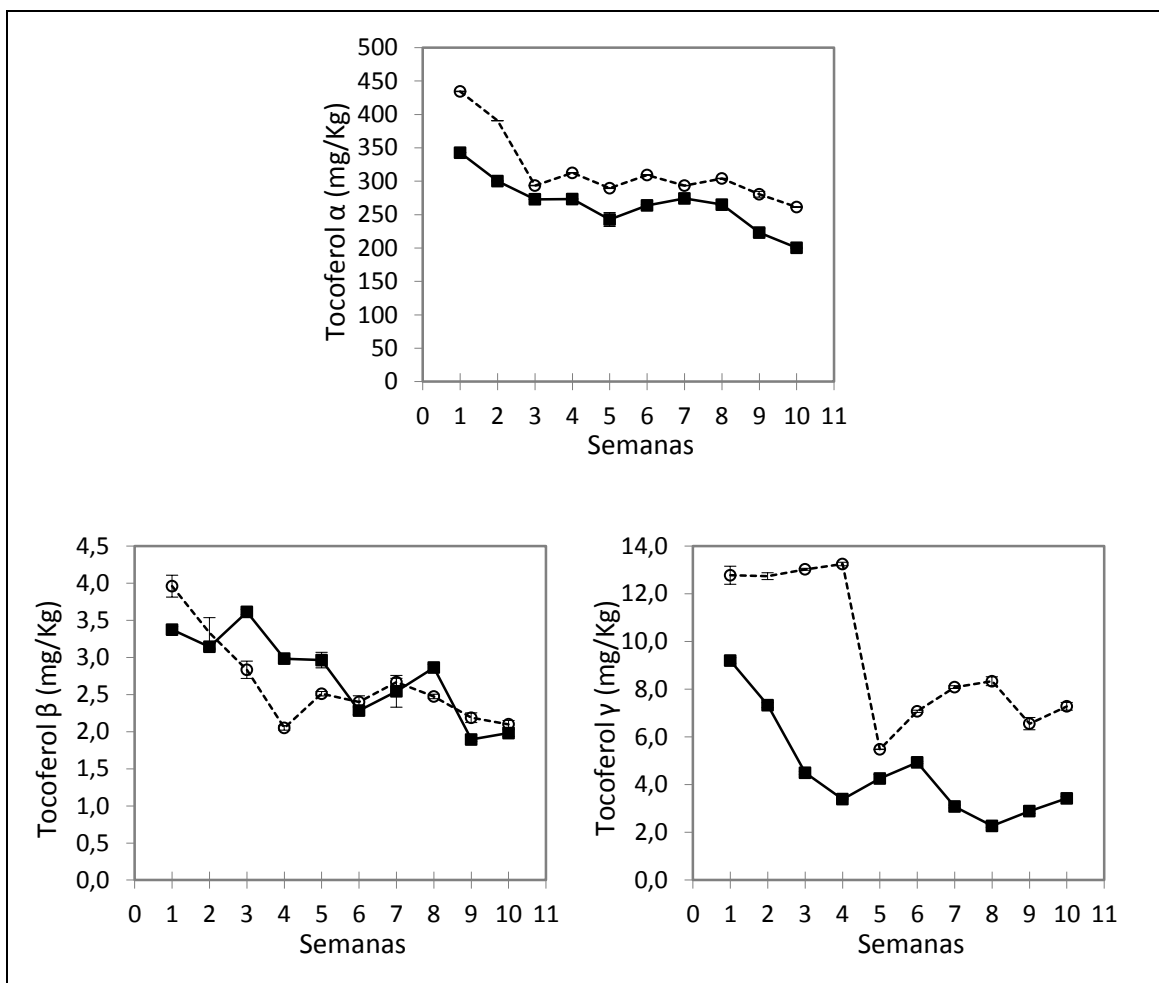


Figura 23 Evolução do teor de tocoferóis α , β e γ com a maturação ao longo das 10 semanas de ensaio para azeites virgens biológicos (○) e convencionais (■) extraídos da cultivar Cordovil de Serpa.

A análise da estabilidade oxidativa será feita mais à frente neste trabalho, após a discussão dos resultados respeitantes ao perfil ácido das amostras analisadas.

A evolução da composição em ácidos gordos não tem total concordância entre autores. Enquanto Cinquanta *et al* (2001) referem um aumento no conteúdo em ácido oleico e uma diminuição no ácido palmítico, Hermoso *et al* (1998) indicam um aumento na percentagem de ácido linoleico, uma diminuição na proporção de ácido palmítico e a constância da percentagem de ácido oleico com a consequente diminuição da relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados. Já Salah *et al* (1984) referem um aumento progressivo da percentagem de ácido oleico desde a maturação ótima, uma diminuição clara do ácido palmítico, uma diminuição

leve do ácido linoleico e uma constância do conteúdo em ácido palmitoleico e esteárico. Baccouri *et al* (2008) observaram uma ligeira diminuição do conteúdo em ácido palmítico, uma descida gradual da percentagem de ácido oleico e um aumento do ácido linoleico.

Na tabela 29 apresentam-se os valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância para o perfil de ácidos gordos das amostras de azeite virgem extraídas durante a maturação da cultivar Cordovil de Serpa, nos modos de produção biológico e convencional. Cada valor médio está associado a três repetições pois foram obtidos a partir de três réplicas laboratoriais de cada amostra (n = 3).

Tabela 29 Composição percentual dos ácidos gordos (média e desvio-padrão) de amostras de azeite virgem extraídas de azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa, produzidas em modo de produção biológico (B) e em modo de produção convencional (C) durante a maturação

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Mon/Pol	9,45 ^f (0,03)	9,45 ^f (0,02)	9,43 ^f (0,01)	9,47 ^f (0,00)	8,77 ^f (0,01)	9,17 ^k (0,02)	9,12 ^k (0,02)	9,74 ^f (0,03)	10,7 ^g (0,01)	11,1 ^f (0,04)	10,4 ^h (0,02)	11,2 ^f (0,02)	12,9 ^e (0,05)	14,4 ^c (0,03)	15,3 ^b (0,03)	15,6 ^a (0,08)	14,4 ^c (0,03)	14,0 ^d (0,04)	12,9 ^e (0,03)	15,2 ^b (0,05)
C16:0	14,1 ^a (0,03)	13,8 ^{bc} (0,03)	13,7 ^{bc} (0,04)	13,7 ^{bc} (0,02)	13,3 ^d (0,05)	13,3 ^d (0,03)	13,0 ^e (0,02)	12,8 ^f (0,02)	12,6 ^{gh} (0,03)	11,4 ^k (0,09)	13,8 ^b (0,02)	13,8 ^{bc} (0,02)	13,7 ^{bc} (0,01)	13,6 ^c (0,01)	12,9 ^e (0,05)	12,7 ^{fg} (0,03)	12,6 ^{gh} (0,02)	12,5 ^h (0,02)	12,3 ⁱ (0,02)	11,8 ^j (0,02)
C16:1	1,36 ^a (0,01)	1,26 ^b (0,03)	1,16 ^c (0,02)	1,13 ^{cd} (0,01)	1,04 ^{e-h} (0,02)	1,09 ^{de} (0,02)	1,06 ^{efg} (0,02)	1,03 ^{f-i} (0,02)	1,02 ^{ghi} (0,01)	1,05 ^{e-h} (0,02)	1,08 ^{def} (0,01)	1,08 ^{def} (0,01)	1,04 ^{e-h} (0,01)	1,00 ^{hij} (0,00)	0,98 ^{ijk} (0,01)	0,98 ^{ijk} (0,01)	0,99 ^{h-k} (0,00)	0,96 ^{kl} (0,01)	0,94 ^{kl} (0,01)	0,91 ^l (0,01)
C17:0	0,08 ^a (0,00)	0,08 ^a (0,01)	0,07 ^{ab} (0,00)	0,06 ^{bc} (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,05 ^{cde} (0,01)	0,05 ^{cde} (0,01)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,06 ^{bc} (0,00)	0,05 ^{cde} (0,01)	0,04 ^e (0,01)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)	0,04 ^e (0,00)
C17:1	0,17 ^a (0,01)	0,14 ^b (0,01)	0,09 ^{de} (0,01)	0,12 ^c (0,01)	0,08 ^{de} (0,01)	0,09 ^{de} (0,00)	0,08 ^{de} (0,01)	0,08 ^{de} (0,00)	0,08 ^{de} (0,00)	0,07 ^e (0,01)	0,10 ^{cd} (0,01)	0,09 ^{de} (0,00)	0,09 ^{de} (0,00)	0,08 ^{de} (0,00)	0,08 ^{de} (0,00)	0,09 ^{de} (0,01)	0,08 ^{de} (0,01)	0,08 ^{de} (0,00)	0,09 ^{de} (0,01)	0,08 ^{de} (0,00)
C18:0	2,53 ^a (0,01)	2,26 ^b (0,02)	2,23 ^b (0,01)	2,11 ^c (0,01)	1,77 ^e (0,02)	1,83 ^f (0,02)	1,91 ^e (0,02)	1,77 ^g (0,01)	1,75 ^{gh} (0,01)	1,71 ^h (0,02)	2,04 ^d (0,02)	1,94 ^e (0,01)	1,63 ⁱ (0,01)	1,51 ^{jk} (0,01)	1,55 ^{jk} (0,01)	1,56 ^j (0,00)	1,55 ^{jk} (0,00)	1,53 ^{jk} (0,01)	1,54 ^{jk} (0,01)	1,49 ^k (0,02)
C18:1	73,1 ^q (0,02)	73,8 ^p (0,06)	74,1 ^o (0,06)	74,2 ⁿ (0,03)	74,5 ^m (0,02)	74,7 ^l (0,05)	74,8 ^k (0,03)	75,7 ^k (0,02)	76,4 ^j (0,02)	77,9 ⁱ (0,04)	74,9 ^h (0,02)	75,5 ^g (0,03)	76,8 ^f (0,01)	77,6 ^e (0,02)	78,4 ^d (0,02)	78,8 ^c (0,03)	78,5 ^c (0,03)	78,5 ^c (0,03)	78,2 ^b (0,04)	79,6 ^a (0,02)
C18:2	6,96 ^g (0,03)	7,04 ^{ef} (0,01)	7,10 ^{de} (0,02)	7,11 ^d (0,00)	7,67 ^a (0,01)	7,34 ^c (0,02)	7,42 ^b (0,02)	6,99 ^g (0,02)	6,38 ^h (0,01)	6,25 ⁱ (0,02)	6,39 ^h (0,02)	5,91 ^j (0,01)	5,15 ^l (0,02)	4,61 ^o (0,01)	4,32 ^q (0,01)	4,28 ^q (0,02)	4,69 ⁿ (0,01)	4,82 ^m (0,02)	5,30 ^k (0,01)	4,47 ^p (0,02)
C18:3	0,96 ^{ab} (0,01)	0,94 ^{bc} (0,01)	0,92 ^{de} (0,01)	0,88 ^g (0,00)	0,98 ^a (0,00)	0,96 ^{ab} (0,01)	0,94 ^{bcd} (0,00)	0,92 ^{cde} (0,01)	0,92 ^{cde} (0,00)	0,88 ^{fg} (0,01)	0,97 ^a (0,01)	0,94 ^{cd} (0,01)	0,89 ^{fg} (0,00)	0,87 ^{gh} (0,01)	0,91 ^{ef} (0,01)	0,85 ^{hi} (0,01)	0,88 ^{gh} (0,01)	0,89 ^{fg} (0,01)	0,88 ^{gh} (0,00)	0,84 ⁱ (0,01)
C20:0	0,38 ^a (0,00)	0,34 ^b (0,01)	0,33 ^{bc} (0,00)	0,33 ^{bc} (0,01)	0,29 ^{e-h} (0,01)	0,30 ^{c-g} (0,00)	0,31 ^{c-f} (0,01)	0,32 ^{b-e} (0,01)	0,31 ^{c-f} (0,00)	0,30 ^{d-g} (0,01)	0,32 ^{b-e} (0,01)	0,29 ^{e-h} (0,01)	0,27 ^{ghi} (0,02)	0,26 ^{hi} (0,00)	0,29 ^{e-h} (0,01)	0,29 ^{e-h} (0,01)	0,29 ^{e-h} (0,00)	0,28 ^{f-i} (0,01)	0,29 ^{e-h} (0,01)	0,25 ⁱ (0,01)
C20:1	0,26 ^{c-g} (0,00)	0,25 ^{d-g} (0,01)	0,25 ^{d-g} (0,00)	0,24 ^{fg} (0,01)	0,25 ^{d-g} (0,01)	0,24 ^{fg} (0,00)	0,24 ^{fg} (0,01)	0,25 ^{d-g} (0,00)	0,26 ^{c-g} (0,00)	0,24 ^{fg} (0,01)	0,29 ^{abc} (0,01)	0,27 ^{a-e} (0,01)	0,28 ^{a-d} (0,01)	0,26 ^{c-g} (0,00)	0,30 ^a (0,01)	0,29 ^{abc} (0,00)	0,28 ^{a-d} (0,01)	0,28 ^{a-d} (0,01)	0,27 ^{a-e} (0,01)	0,28 ^{a-d} (0,01)
C22:0	0,11 ^a (0,01)	0,11 ^a (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)	0,10 ^a (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)	0,10 ^a (0,00)	0,08 ^b (0,01)	0,10 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)	0,08 ^b (0,01)	0,08 ^b (0,00)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,08 ^b (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,01)	0,09 ^{ab} (0,00)
C24:0	0,08 ^a (0,00)	0,07 ^{ab} (0,00)	0,06 ^{abc} (0,01)	0,06 ^{abc} (0,01)	0,05 ^{bc} (0,00)	0,05 ^{bc} (0,01)	0,05 ^{bc} (0,00)	0,05 ^{bc} (0,00)	0,06 ^{abc} (0,01)	0,04 ^c (0,01)	0,07 ^{ab} (0,01)	0,07 ^{ab} (0,00)	0,08 ^a (0,00)	0,05 ^{bc} (0,00)	0,07 ^{abc} (0,01)	0,08 ^a (0,01)	0,07 ^{ab} (0,01)	0,06 ^{abc} (0,00)	0,06 ^{abc} (0,01)	0,05 ^{bc} (0,00)

a,b,c,... Médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé). Os algarismos 1 – 10, a seguir à letra B e C correspondem a 10 semanas de colheita das azeitonas e análise do azeite, entre os dias 13 de Outubro e 20 de Dezembro de 2011

Em relação ao perfil de ácidos gordos das amostras analisadas verifica-se, na tabela 29, que as amostras de azeite virgem biológico apresentaram um teor de ácido palmítico (C16:0) superior às de azeite virgem convencional, principalmente durante as primeiras semanas do ensaio. Esta diferença atenuou-se no final da maturação, uma vez que o conteúdo em ácido palmítico do azeite biológico sofreu uma diminuição mais acentuada durante o amadurecimento das azeitonas, passando de 14,11% na primeira semana, para 11,43% na última semana do ensaio. Em relação ao azeite virgem convencional, a descida foi de 13,80% no início da maturação para 11,83% na décima semana.

Os ácidos gordos que verdadeiramente se diferenciaram com o modo de produção das azeitonas foram o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2), apresentando diferenças significativas ao longo da maturação e mesmo entre modos de produção. Assim, o azeite obtido das azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa produzidas em modo de produção convencional atingiram um teor de ácido oleico significativamente superior ao azeite extraído de azeitonas em modo de produção biológico (tabela 29). A percentagem aumentou com o amadurecimento das azeitonas em ambos os modos de produção, variando entre 73,07% na primeira semana (13 de Outubro) e 77,94% na última semana do ensaio (20 de Dezembro) para o azeite biológico e entre 74,85% e 79,64% para o azeite convencional.

Para o ácido linoleico, obtiveram-se valores superiores para o azeite biológico. A percentagem deste ácido subiu ligeiramente até meio do período em análise, ou seja até à semana 5 (15 de Novembro), alcançando 7,67% e voltando depois a descer até ao final do período em análise, onde o valor mínimo foi de 6,25%. A evolução do teor em ácido linoleico no azeite convencional foi quase a oposta à do azeite biológico: houve inicialmente uma descida do teor, alcançando o valor mínimo na semana 6 (23 de Novembro), 4,28%, e depois uma subida até à semana 9 (12 de Dezembro), onde atingiu o valor máximo, 5,30%.

Para ambos os modos de produção, houve uma descida na composição dos ácidos palmitoleico (C16:1) e esteárico (C18:0) durante o amadurecimento das azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa.

Os resultados obtidos não concordam totalmente com os autores citados no início deste ponto. De acordo com a bibliografia consultada e referida no ponto 2.2 deste trabalho, pode considerar-se que a cultivar Cordovil de Serpa é uma cultivar com um teor médio alto de ácido oleico e um teor relativamente baixo de ácido linoleico, principalmente quando cultivada em modo de produção convencional. De realçar o facto de os azeites virgens extraídos desta cultivar apresentarem um teor de ácido linolénico (C18:3) muito elevado, tendo em conta que o máximo permitido por lei para os azeites virgens é de 1%.

Devido às diferenças no perfil ácido dos azeites obtidos nos dois modos de produção, principalmente em relação aos ácidos oleico e linoleico, obtiveram-se razões ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) superiores para o azeite virgem convencional (tabela 29). Esta razão foi aumentando com a evolução da maturação para os azeites de ambos os modos de produção, a acompanhar as alterações nos teores dos ácidos gordos. Estes resultados estão em completo desacordo com Baccouri *et al* (2008). Os autores afirmam que, durante o amadurecimento dos frutos, os ácidos oleico e linoleico mostram um comportamento oposto, uma vez que o conteúdo em ácido oleico vai diminuindo gradualmente com a maturação e o teor ácido linoleico aumentando, levando à diminuição da razão ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados. Os autores explicam este comportamento com a atividade da enzima oleato dessaturase, que transforma o ácido oleico em linoleico.

Na figura 24 observa-se, graficamente, a evolução dos principais ácidos gordos ao longo das dez semanas de amadurecimento das azeitonas produzidas em modo de produção biológico e convencional.

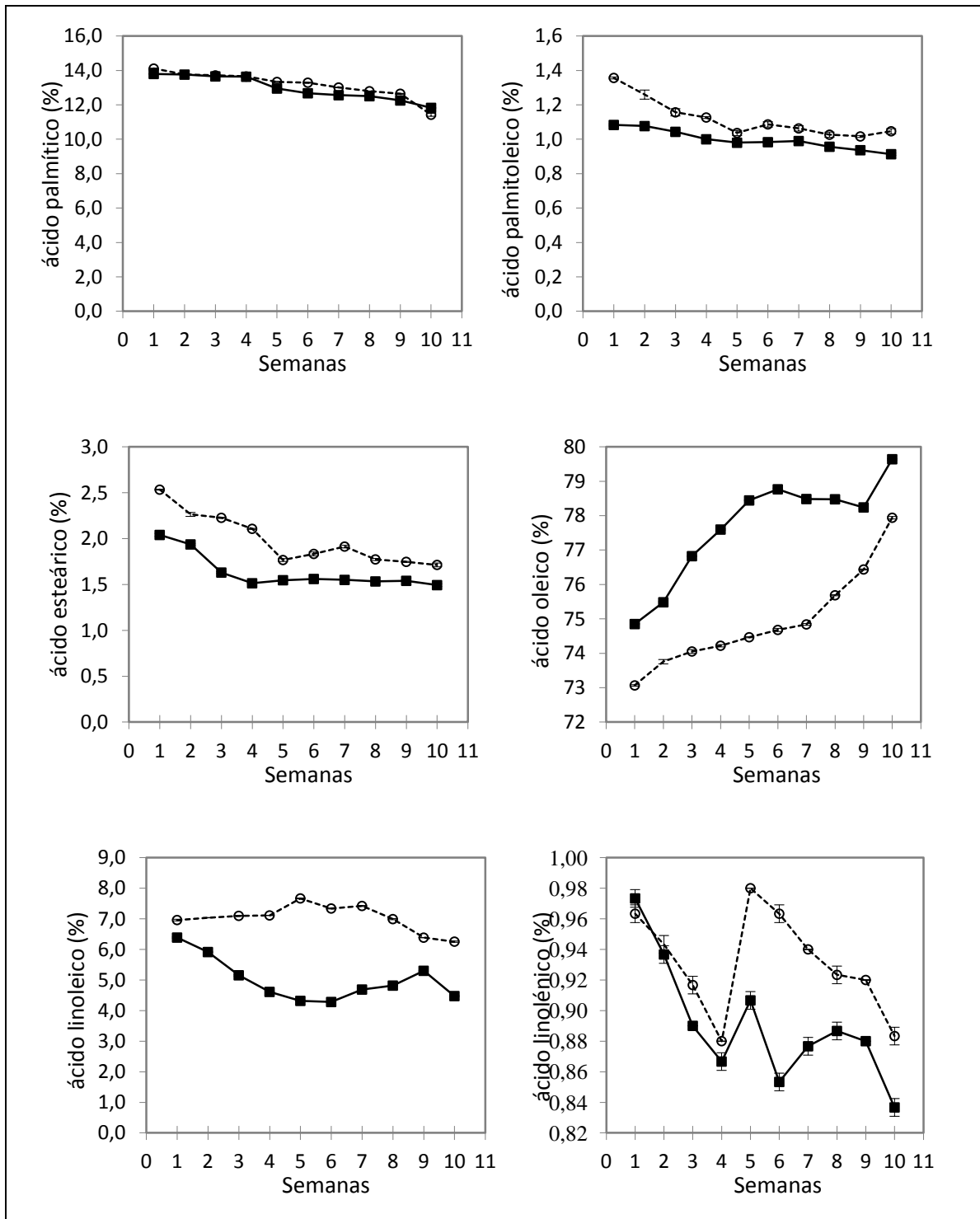


Figura 24 Evolução dos principais ácidos gordos durante a maturação de azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa produzida nos modos de produção biológico (○) e convencional (■)

Em relação à estabilidade oxidativa das amostras de azeite, medida pelo rancimat, não se observou uma diferença acentuada entre modos de produção, embora os valores tenham sido um pouco mais elevados para as amostras de azeite obtidas em modo de produção biológico, no início e no final da maturação.

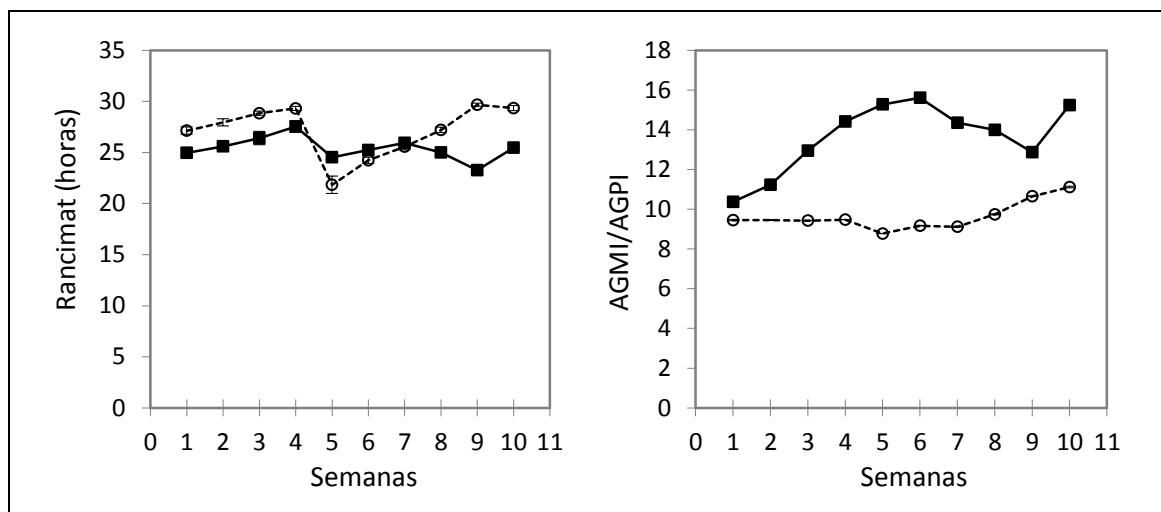


Figura 25 Estabilidade oxidativa, medida pelo rancimat (horas) e relação AGMI/AGPI das amostras de azeite virgem extraídas da cultivar Cordovil de Serpa, durante a maturação das azeitonas produzidas em modo de produção biológico (○) e convencional (■).

Os fatores que mais contribuem para a estabilidade de uma azeite virgem são a razão ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/ AGPI) e o conteúdo em antioxidantes naturais. Assim, tendo em conta todas as amostras de azeite em simultâneo verifica-se que, apesar dos azeites obtidos em modo de produção convencional terem uma razão AGMI/AGPI bastante mais elevada, são os azeites obtidos em modo de produção biológico que apresentam um teor em compostos fenólicos e em tocoferóis significativamente superior e este fator parece ter tido mais peso na estabilidade dos azeites do que a razão AGMI/AGPI. No entanto, ao observar a evolução do azeite de cada modo de produção individualmente verifica-se que o azeite biológico atinge os valores mais elevados de estabilidade oxidativa nas semanas 4 (29,3 h), 9 (29,7 h) e 10 (29,3 h) e o azeite convencional nas semanas 3 (26,4 h), 4 (27,5 h) e 7 (25,9h). Da análise conjunta das tabelas 28 e 29 e das figuras 18, 19, 20, 21 e 22 parece poder concluir-se que, para o azeite biológico, existe, em termos absolutos, uma maior contribuição do conteúdo em antioxidantes (compostos fenólicos totais, tirosol, tocoferóis α e γ) para a estabilidade oxidativa no início da maturação, em detrimento da relação AGMI/AGPI. No final da maturação é a relação

ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) que mais contribuiu para os valores mais elevados de estabilidade, medida pelo rancimat, do azeite biológico. De facto, é na semana 5 que este azeite atinge o menor valor de estabilidade oxidativa, correspondendo também ao menor valor da razão AGMI/AGPI, aumentando constantemente a partir de aí até à semana 9, acompanhando o aumento da razão AGMI/AGPI. Para o azeite convencional não se verificou uma relação tão clara entre a estabilidade e a composição em antioxidantes e ácidos gordos. Assim, enquanto os valores de estabilidade oxidativa atingidos nas semanas 4 e 7 parecem estar relacionados com os teores mais elevados de compostos fenólicos totais, já o valor obtido na semana 3 não está de acordo com os teores de antioxidantes nem com a razão AGMI/AGPI.

Na tentativa de identificar as diferenças nos azeites extraídos da cultivar Cordovil de Serpa de acordo com o seu modo de produção (modo de produção biológico e modo de produção convencional) em relação ao seu comportamento durante a maturação, foi utilizado o método da análise em componentes principais (ACP), a partir dos resultados das análises químicas efetuadas a todas as amostras referentes a 16 atributos, nomeadamente: compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, tirosol, tocoferol α , tocoferol β , tocoferol γ , estabilidade oxidativa (rancimat), relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) e os ácidos gordos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), margárico (C17:0), margaroleico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3). Na tabela 30 apresentam-se os valores próprios e a extração dos componentes principais.

Tabela 30 Valores próprios e extração dos componentes principais.

Componente principal	Valor próprio	Variância (%)	Valor próprio Acumulado	Variância acumulada (%)
1	9,38	58,64	9,38	58,63
2	2,93	18,34	12,31	76,97
3	1,57	9,81	13,89	86,79
4	0,75	4,67	14,63	91,46
5	0,51	3,21	15,15	94,67
6	0,33	2,07	15,48	96,74
7	0,16	1,03	15,64	97,78
8	0,15	0,92	15,79	98,70
9	0,08	0,50	15,87	99,20
10	0,05	0,32	15,92	99,52
11	0,04	0,23	15,96	99,75
12	0,02	0,12	15,98	99,88
13	0,01	0,06	15,99	99,94
14	0,01	0,05	15,99	99,99
15	0,00	0,00	16,00	100,00
16	0,00	0,00	16,00	100,00

Os dois primeiros componentes principais explicaram 77% da variância: 58,6% para o primeiro componente e 18,3% para o segundo. Note-se que apesar de se terem considerado apenas os 2 primeiros componentes, o terceiro também apresentou valor próprio superior a 1. Só estes componentes foram significativos, uma vez que são os que apresentaram maior valor próprio. Estando em análise 16 atributos, à partida, cada um deles tem o valor próprio de 1. Com esta metodologia, estes 16 atributos são transformados em 16 componentes, redefinindo o espaço e passando a ter valores próprios diferentes. Assim, por apresentarem valores próprios mais elevados, definiram-se os dois primeiros componentes como componentes principais: o primeiro teve valor próprio de 9,4 e o segundo valor próprio 2,9.

Para perceber a importância relativa de cada atributo em relação a cada um dos dois primeiros componentes principais, determinaram-se os coeficientes de correlação entre os atributos (parâmetros originais) e os componentes principais (Tabela 31).

Tabela 31 Coeficientes de correlação entre os atributos (variáveis iniciais) e os dois primeiros componentes principais

Atributo	Componente	
	CP1	CP2
polifenóis totais (mg/Kg)	-0,708*	0,430
Tirosol (mg/Kg)	-0,515	0,721*
Hidroxitirosol (mg/Kg)	-0,360	0,813*
tocoferol α (mg/Kg)	-0,901*	-0,291
tocoferol β (mg/Kg)	-0,479	-0,748*
tocoferol γ (mg/Kg)	-0,913*	0,052
Rancimat (h)	-0,306	0,030
AGMI/AGPI	0,846*	-0,395
C16:0 (%)	-0,722*	-0,387
C16:1 (%)	-0,938*	-0,250
C17:0 (%)	-0,876*	-0,325
C17:1 (%)	-0,752*	-0,433
C18:0 (%)	-0,959*	-0,138
C18:1 (%)	0,968*	-0,092
C18:2 (%)	-0,826*	0,478
C18:3 (%)	-0,724*	0,048

* correlações significativas ($r > 0,7$), segundo Liu *et al* (2003).

Os resultados da análise mostraram que o 1º componente principal, CP1, é explicado, com maior peso, pelos compostos fenólicos totais (polifenóis totais), tocoferol α , tocoferol γ , ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido margaroleico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido linoleico (C18:2) e

ácido linolénico (C18:3), com valor de correlação negativo e pelos relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) e oleico (C18:1), com valor de correlação positivo.

O 2º componente principal, CP2, é explicado pelo tocoferol β , com valor de correlação negativo e pelos tirosol e hidroxitirosol, com valor de correlação positivo. Assim, na figura 26 pode observar-se a distribuição dos atributos no plano principal formado pelos dois primeiros componentes.

E na figura 27 pode observar-se a projeção das amostras dos dois modos de produção ao longo da maturação no plano principal.

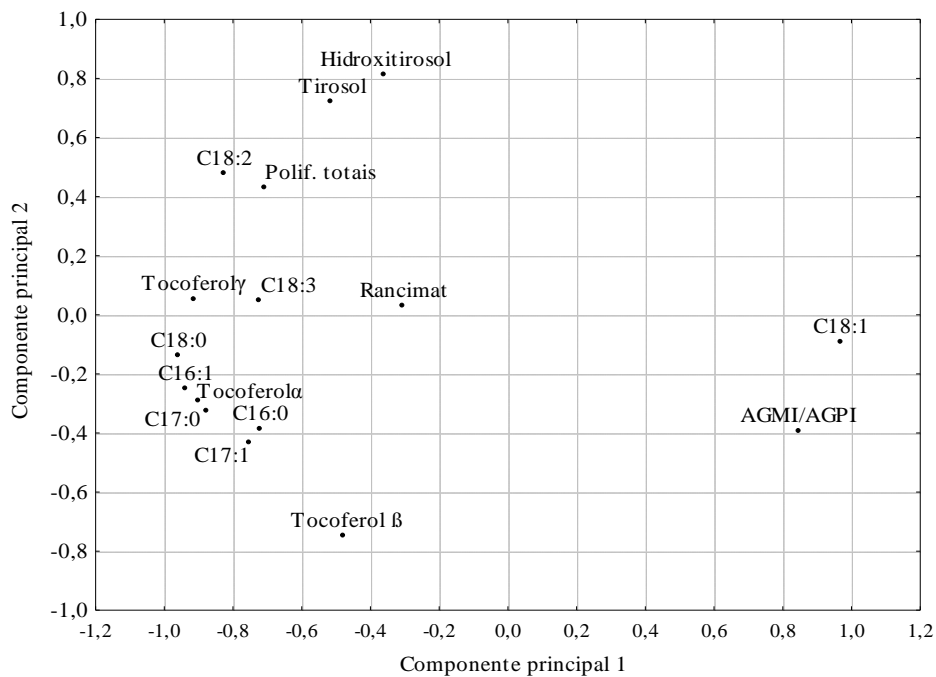


Figura 26 Distribuição dos atributos no plano

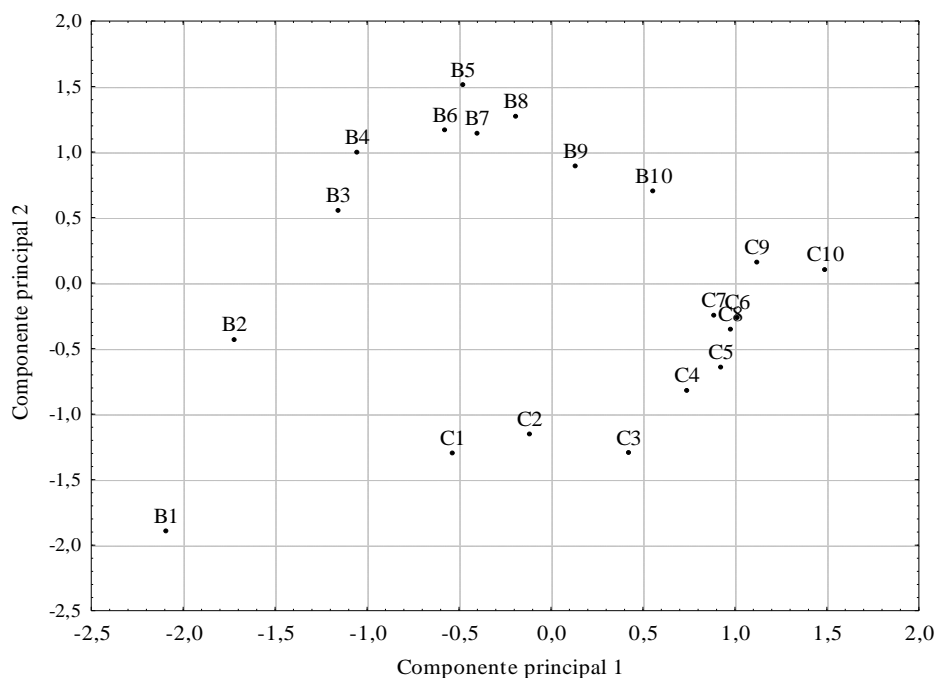


Figura 27 Projeção das amostras nos dois modos de produção ao longo da maturação no plano principal

De acordo com as figuras 26 e 27, verifica-se uma total separação das amostras por modo de produção, principalmente devido ao conteúdo em ácido oleico (C18:1) e à relação ácidos gordos monoinsaturados/ ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) nos azeites virgens obtidos no modo de produção convencional, e ao conteúdo em antioxidantes naturais: compostos fenólicos totais, tirosol, hidroxitirosol e tocoferóis α e γ no início da maturação e também ao conteúdo mais elevado em ácido linoleico (C18:2) nos azeites biológicos obtidos da cultivar Cordovil de Serpa.

Na evolução da maturação das amostras de azeite convencional, verifica-se uma acentuação da diferenciação em relação ao mais elevado conteúdo em ácido oleico e da razão AGMI/AGPI, a partir da semana 4. Nas primeiras três semanas, as amostras separam-se pelo conteúdo em tocoferol β . As amostras de azeite biológico separam-se, nas quatro primeiras semanas de maturação, essencialmente em relação à composição em ácidos gordos (exceto o ácido oleico) e conteúdo em tocoferol α e compostos fenólicos totais. A partir da semana 4 acentua-se a diferença devido essencialmente ao mais elevado teor em hidroxitirosol.

6.3.3 – Relação entre a composição mineral dos solos e a composição em ácidos gordos e antioxidantes dos azeites

Em 2009, os Estados Membros da União Europeia acordaram na obrigação da colocação da origem nos rótulos dos azeites virgem e virgem extra (Regulamento CE 182/2009) para evitar o desconhecimento e engano do consumidor em relação à sua origem e características.

A nutrição mineral dos solos não é tradicionalmente considerada um factor importante para a qualidade do azeite (Erel *et al* (2013), Fiorino *et al* (1996), Uceda *et al* (2010)). Assim, e uma vez que é, no entanto, essencial na obtenção de elevada produtividade, a maioria dos ensaios realizados, relacionados com a nutrição mineral da oliveira, debruça-se sobre o seu efeito na produtividade e não na composição do azeite.

Contrariando esta linha de trabalho e, de acordo com ensaios realizados por alguns autores como Dag *et al* (2009) que afirmam poder haver uma relação entre o estado nutricional da oliveira e a composição do azeite, o objectivo da presente etapa do ensaio foi verificar se se poderá estabelecer uma ligação entre a composição do solo e as diferenças encontradas na composição dos azeites virgens obtidos nos olivais conduzidos em modo de produção biológico e convencional.

Como já foi referido anteriormente neste trabalho, a composição final do azeite virgem depende de inúmeros factores relacionados com a cultura da oliveira e com a colheita, armazenamento e tecnologia de extração dos frutos. De realçar a influência da cultivar, da data de colheita dos frutos, das características pedoclimáticas da região, assim como da fertilização e irrigação das árvores.

Para obviar a influência destes factores no objectivo do ensaio, as amostras dos solos foram colhidas na semana 5 (15 de Novembro) e analisadas as composições médias dos azeites virgens extraídos nas semanas 5, 6 e 7 (15, 23 e 29 de Novembro), correspondentes à maturação média da azeitona. Optou-se pela maturação média da azeitona, uma vez que é nesta altura que os frutos atingem o seu conteúdo máximo em azeite e a maior parte dos olivicultores colhe a azeitona para a extração do azeite. De acordo com Uceda *et al* (2008), o teor de compostos fenólicos totais varia ao longo

da maturação segundo uma curva de segundo grau, atingindo o valor máximo na altura em que termina a lipogénese, ou seja, quando se atingiu o conteúdo máximo de azeite nos frutos. Os olivais analisados situam-se no mesmo concelho, pelo que as condições climáticas são idênticas. Em relação ao tipo de solos nos dois olivais verificou-se que, embora não sejam idênticos, são muito semelhantes, tendo o olival conduzido em modo de produção convencional sido classificado pelo laboratório C+E Analítica, S.L., como franco-argilo-arenoso (22,33% argila; 27,20% limo e 50,43% areia) e o solo conduzido em modo de produção biológico classificado como franco (21,40% argila, 29,10% limo e 49,50% areia).

Após análise mineral dos solos, aplicou-se o teste de correlação de Pearson para verificar a relação entre os minerais analisados e a composição em antioxidantes (compostos fenólicos totais, hidroxitirosol, tirosol, tocoferol α , tocoferol β e tocoferol γ) e os principais ácidos gordos (palmítico, oleico e linoleico) dos respectivos azeites virgens.

Na tabela 32 apresentam-se os valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância da composição média do solo em função do modo de produção (convencional e biológico) e a correlação de Pearson entre a composição do solo e os constituintes do azeite de maturação média (correspondentes às semanas 5, 6 e 7).

Tabela 32 Valores médios, desvios padrão e resultados da análise de variância da composição média do solo de em função do modo de produção (convencional e biológico); correlações de Pearson entre a composição do solo e os constituintes do azeite de maturação média

Composição do solo	Modo de produção		Correlação (composição do solo vs constituintes do azeite)											
	Convencional	Biológico	CFT	HT	T	Toc α	Toc β	Toc γ	C16:0	C18:1	C18:2			
N (mg/Kg)	1923,3(552,3) ^a	1533,3(277,9) ^a	-0,08	-0,63	-0,24	-0,34	0,24	-0,80	-0,48	0,43	-0,39			
P (mg/Kg)	108,9(38,7) ^a	19,8(9,5) ^b	-0,53	-0,85*	-0,78	-0,73	-0,22	-0,68	-0,77	0,90*	-0,90*			
K (meq/100g)	0,51(0,08) ^a	0,48(0,09) ^a	0,19	-0,33	0,05	0,24	-0,56	-0,45	-0,20	0,19	-0,17			
Ca (meq/100g)	20,6(4,96) ^a	24,3(0,36) ^a	0,38	0,60	0,26	0,13	0,26	0,63	0,79	-0,54	0,48			
Mg (meq/100g)	3,29(0,48) ^a	3,19(1,30) ^a	-0,69	0,12	-0,29	-0,23	0,62	0,30	-0,26	0,09	-0,09			
Na (meq/100g)	0,38(0,03) ^b	1,35(0,20) ^a	0,77	0,91*	0,93*	0,89*	-0,23	0,74	0,88*	-0,98*	0,97*			
B (mg/Kg)	3,39(0,68) ^a	4,20(0,40) ^a	0,61	0,61	0,78	0,86*	-0,83*	0,53	0,46	-0,64	0,66			
Fe (mg/Kg)	139,82(22,93) ^a	50,30(3,25) ^b	-0,62	-0,91*	-0,88*	-0,82*	-0,04	-0,74	-0,80	0,97*	-0,97*			
Cu (mg/Kg)	14,07(3,73) ^a	6,44(2,18) ^b	-0,68	-0,84*	-0,69	-0,64	0,22	-0,78	-0,92*	0,83*	-0,79			
Zn (mg/Kg)	5,56(0,53) ^a	1,26(0,27) ^b	-0,64	-0,95*	-0,93*	-0,89*	0,12	-0,80	-0,80	0,99*	-0,99*			
Mn (mg/Kg)	71,36(6,94) ^b	132,52(10,79) ^a	0,72	0,91*	0,97*	0,84*	-0,18	0,73	0,77	-0,97*	0,99*			
pH	7,57(0,20) ^b	8,17(0,13) ^a	0,47	0,93*	0,72	0,70	0,18	0,84*	0,84*	-0,91*	0,89*			
MO (% p/p)	4,74(0,34) ^a	2,21(0,58) ^b	-0,76	-0,89*	-0,89*	-0,84*	0,12	-0,71	-0,91*	0,97*	-0,95*			
C/N	15,20(5,15) ^a	8,52(2,63) ^a	-0,71	-0,55	-0,76	-0,67	-0,09	-0,27	-0,67	0,75	-0,76			
Mg/K	5,57(3,21a) ^a	7,23(4,48) ^a	-0,34	0,37	0,01	-0,03	0,74	0,43	0,1	-0,24	0,24			
Ca/Mg	6,30(1,31) ^a	8,47(3,01) ^a	0,90*	0,36	0,54	0,38	-0,38	0,19	0,76	-0,52	0,49			
Argila (%)	22,33(2,00) ^a	21,40(1,42) ^a	-0,09	-0,41	-0,2	-0,03	0,15	-0,53	-0,24	0,27	-0,27			
Limo (%)	27,20(6,18) ^a	29,10(0,75) ^a	0,12	0,15	0,44	0,51	-0,04	-0,03	-0,08	-0,27	0,33			
Areia (%)	50,43(7,99) ^a	49,50(1,44) ^a	-0,07	0,01	-0,28	-0,39	-0,01	0,2	0,14	0,13	-0,17			

a, b – médias na mesma linha com índices diferentes têm diferenças significativas para P<0,05, n=3 (teste de Scheffé); * Correlações significativas (P<0,05);

A análise aos solos conduzidos em modo de produção convencional e biológico mostrou diferenças estatisticamente significativas na composição mineral em relação a: fósforo (P), sódio (Na), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), pH e matéria orgânica (MO). Os valores foram geralmente superiores para o solo conduzido em modo de produção convencional, excepto para os teores em sódio e manganês e ainda para o valor do pH, que foram mais elevados no solo conduzido em modo de produção biológico.

A maior parte dos ensaios encontrados na bibliografia analisam apenas a influência dos macronutrientes azoto, fósforo e potássio, aplicados na fertilização dos solos, nas características dos azeites extraídos. Assim, em trabalhos realizados por Gutiérrez *et al* (1999), os autores observaram um teor superior de ácido oleico e inferior de ácido linoleico em azeites virgens provenientes de olivais conduzidos em modo de produção biológico mas, em ensaios conduzidos por Alcobilla *et al* (2002), Inglese *et al* (2002) e Wiesman *et al* (2002) não foi encontrada qualquer relação entre a aplicação de azoto (N), fósforo (P) e potássio (K) e a composição em ácidos gordos do azeite. Estudos mais recentes, no entanto, voltam a indicar que os macronutrientes podem ter efeito em alguns compostos do azeite. Em um ensaio de longa duração com azoto (N), Fernández-Escobar *et al* (2006) e Fernández-Escobar *et al* (2009) reportaram que uma fertilização com elevado nível de N causou uma diminuição no conteúdo de compostos fenólicos totais. Em outro ensaio Morales-Sillero *et al* (2007), concluíram que quantidades crescentes de N, P e K resultavam na diminuição dos compostos fenólicos, diminuição da percentagem de ácido oleico e conseqüente aumento da percentagem de ácido linoleico. O mesmo concluíram Dag *et al* (2009) ao reportar uma diminuição do ácido oleico e compostos fenólicos em resposta a níveis elevados de N e P, enquanto que para o K, o efeito não foi significativo. Todos estes ensaios implicaram a adição de quantidades controladas dos diferentes macronutrientes, o que não aconteceu no presente ensaio em que se pretendeu caracterizar o solo dos olivais estudados, relacionando a sua composição com as diferenças encontradas nos respectivos azeites virgens, com o objectivo último de contribuir para a sua rastreabilidade geográfica.

Como se pode observar na tabela 32, não foram encontradas diferenças significativas nos teores de azoto (N) e potássio (K) dos solos nos dois modos de produção, pelo que as diferenças encontradas na composição química dos respectivos azeites virgens não se correlacionam com estes dois macronutrientes. De acordo com o laboratório C+E Analítica, S.L., o nível de azoto (N) nos dois solos foi considerado médio e o nível de potássio (K) considerado deficiente, o que afecta o tamanho e as características dos frutos. Curiosamente, em relação ao fósforo (P), observou-se que os resultados obtidos no presente ensaio foram contrários aos determinados pelos autores referidos no parágrafo anterior. De facto, verificou-se uma correlação positiva do fósforo com o ácido oleico (C18:1) e negativa com o ácido linoleico (C18:2), o que significa que, quanto mais elevado é o nível de fósforo no solo, mais elevado é o teor de ácido oleico e mais baixo o teor de ácido linoleico no azeite. Este resultado pode ser comprovado pela análise da tabela 29 (página 151), onde se verifica que as amostras de azeite convencional apresentam um teor consideravelmente mais elevado de ácido oleico e inferior de ácido linoleico do que as amostras de azeite biológico. Tal como Sanchez e Harwood (2002), Dag *et al* (2009) justificam a influência dos teores de azoto (N), fósforo (P) e potássio (K) na composição em ácidos gordos do azeite com o aumento ou inibição da actividade da enzima oleato desaturase durante a biossíntese dos triacilgliceróis. O autor conclui que a existência de resultados díspares encontrados em diferentes trabalhos resultam de diferenças nas cultivares de azeitona estudadas e/ou diferenças em condições ambientais como tipo de solo e clima, uma vez que o nível óptimo de nutrientes, que influencia tanto a quantidade como a composição do azeite, é específico para cada cultivar.

Em relação aos compostos fenólicos, os resultados obtidos neste ensaio acompanham na generalidade os referidos pelos autores citados anteriormente ou seja, o aumento do teor de fósforo no solo afecta negativamente o teor de compostos fenólicos no azeite. No presente ensaio verificou-se uma correlação negativa entre o teor de fósforo (P) e o conteúdo do composto fenólico hidroxitirosol (HT). De acordo com os resultados obtidos, o nível médio de fósforo (P) das amostras do solo conduzido em modo de produção convencional (108,9 mg/Kg) considera-se mediano, enquanto que este teor no solo em modo de produção biológico (19,8 mg/Kg) é baixo, podendo,

eventualmente, a planta encontrar-se em stress nutricional, o que influenciaria o conteúdo em compostos fenólicos do azeite, levando ao observado aumento. De facto, em um ensaio realizado por Dag *et al* (2009), os autores referem uma diminuição acentuada no conteúdo em compostos fenólicos em azeites virgens obtidos da cultivar Barnea, com o aumento do teor de fósforo (P) aplicado às oliveiras. Para Dag *et al* (2009) uma possível justificação seria a activação, em situações de stress, da enzima fenilalanina amónia liase, que catalisa a síntese da grande maioria dos compostos fenólicos.

As amostras de solo em modo de produção biológico apresentam um nível muito elevado em sódio (1,35 meq/ 100g) e o solo em modo de produção convencional um nível adequado de 0,38 meq/ 100g. Verificou-se que este elemento foi o que mais afectou as características dos azeites extraídos, tanto em relação à composição em ácidos gordos como em relação ao conteúdo em antioxidantes. Da análise da tabela 6.7, pode observar-se uma correlação do sódio (Na) com quase todos os parâmetros analisados no azeite. A correlação foi positiva com os principais compostos antioxidantes (hidroxitirosol (HT), tirosol (T) e tocoferol- α (Toc α)) e ainda com os ácidos gordos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2) e negativa com o ácido oleico (C18:1). De acordo com Fernández-Escobar (2008), o excesso de iões de cloro e sódio (Na) em solução no solo pode causar toxicidade nas plantas, pelo que o conteúdo excessivo de sódio (Na) no solo conduzido em modo de produção biológico pode ter provocado stress ambiental nas oliveiras levando à activação de enzimas responsáveis pela produção de compostos antioxidantes e influenciado também a actuação das enzimas que intervêm na biossíntese dos ácidos gordos.

A outra característica do solo que teve uma influência tão acentuada como o sódio na composição das amostras de azeite virgem foi o teor de matéria orgânica (MO). No entanto, neste caso, a correlação foi inversa à verificada para o sódio, observando-se uma correlação negativa do teor de matéria orgânica com os compostos antioxidantes (HT, T e Toc α) e com os ácidos palmítico e linoleico e uma correlação positiva com o ácido oleico. Neste ensaio e, de acordo com o laboratório C+E Analítica, S.L, o solo do olival conduzido em modo de produção convencional apresentou um teor considerado elevado de matéria orgânica (4,74%) e uma relação carbono/azoto adequada e o solo

do olival conduzido em modo de produção biológico apresentou um teor de matéria orgânica considerado médio (2,21%) mas uma relação carbono/azoto baixa pelo que o solo se encontra esgotado. De acordo com Bot e Benites (2005), o teor de matéria orgânica afecta tanto as propriedades químicas como físicas do solo, como por exemplo a capacidade de retenção de água e a disponibilidade de nutrientes, pelo que um teor inferior de matéria orgânica poderá potenciar o nível de stress hídrico e ambiental das oliveiras, tendo como resultado um aumento do conteúdo em compostos antioxidantes no azeite. Não foi encontrada na bibliografia, informação sobre a relação do teor de matéria orgânica com o mecanismo de síntese de ácidos gordos na azeitona.

Os micro-nutrientes ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn) também influenciaram consideravelmente a composição dos azeites virgens. Embora os valores determinados sejam considerados baixos para ambos os solos (excepto o teor de manganês no solo do olival biológico que apresentou um valor médio), houve diferenças significativas entre eles, permitindo estabelecer correlações com muitos dos constituintes analisados nos azeites. De facto, os dois solos são extremamente deficientes em ferro e zinco comprometendo tanto as reações de respiração e fotossíntese da planta como a qualidade das azeitonas (Laboratório C+E Analítica, S.L.). O solo convencional apresentou um teor de ferro de 139,82 mg/Kg e de zinco de 5,56 mg/ Kg e o solo biológico um teor de ferro de 50,30 mg/Kg e de zinco de 1,26 mg/Kg, sendo que os níveis destes nutrientes são considerados adequados a partir de 300 mg/Kg para o ferro e de 80 mg/Kg para o zinco. A relação entre estes dois elementos e a composição do azeite foi semelhante, observando-se uma correlação negativa com os seguintes compostos antioxidantes: hidroxitirosol (HT), tirosol (T) e tocoferol α (Toc α) e ainda com o ácido gordo linoleico (C18:2) e uma correlação positiva com o ácido oleico (C18:1). Em solos calcários com pH elevado o ferro (Fe) e o zinco (Zn) tornam-se indisponíveis para a planta pelo que a situação se torna ainda mais grave no solo conduzido em modo de produção biológico, agravando a situação de stress das oliveiras o que poderá justificar o conteúdo mais elevado de compostos antioxidantes nos azeites virgens extraídos de azeitonas produzidas neste olival.

A influência do micronutriente manganês (Mn) nos componentes dos dois azeites analisados foi inversa à do ferro e zinco. O solo do olival conduzido em modo de produção convencional apresentou um teor ligeiramente deficiente neste elemento (71,36 mg/Kg) e o solo do olival conduzido em modo de produção biológico, um teor adequado (132,52 mg/Kg). O intervalo de valores considerados adequados de acordo com o laboratório C+E Analítica, S.L., situa-se entre 80 e 200 mg/Kg. Assim, ao contrário do que seria de esperar, encontrou-se uma correlação positiva entre o manganês (Mn) e os principais compostos antioxidantes analisados no azeite: hidroxitirosol (HT), tirosol (T) e tocoferol α (Toc α), o que contribui para o facto de as amostras de azeite biológico analisadas terem um conteúdo mais elevado nestes compostos. Em relação à composição nos ácidos gordos seleccionados, o teor de manganês (Mn) influenciou positivamente o teor de ácido linoleico e negativamente o teor de ácido oleico. De acordo com Mousavi *et al* (2011), o manganês (Mn) actua como factor de activação para mais de 35 enzimas pelo que, o facto de, neste ensaio, haver uma correlação positiva entre o teor de manganês e o conteúdo em compostos fenólicos do azeite, pode significar que este micronutriente participa na activação de enzimas responsáveis pela síntese de compostos antioxidantes na azeitona da cultivar Cordovil de Serpa e também na activação ou inibição de enzimas intervenientes na biossíntese dos ácidos gordos. De acordo com o mesmo autor, solos calcários com pH elevado tendem a ser deficientes em manganês (Mn); no entanto, curiosamente, nos solos seleccionados para este ensaio, verificou-se o oposto, sendo o solo conduzido em modo de produção biológico o que apresentou o valor mais elevado de pH e simultaneamente o conteúdo mais elevado em manganês (Mn). A disponibilidade de alguns nutrientes é, no entanto, muito afectada pelo pH do solo, considerando-se ser o pH ideal perto da neutralidade, entre o ligeiramente ácido e o ligeiramente alcalino (6,5 – 7,5). Enquanto o azoto (N) e o potássio (K) são pouco afectados pela variação do pH do solo, a pH superior a 7,5 o fósforo (P) tende a reagir com o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) formando compostos insolúveis. A grande maioria dos micronutrientes também se encontra menos disponível a pH superior a 7,5. Em relação ao valor do pH dos solos estudados, verifica-se que o solo conduzido em modo de produção convencional é ligeiramente alcalino, com um valor de pH de 7,57 e o solo conduzido em modo de produção biológico, alcalino, com um valor de pH de 8,17. Esta variação

de pH entre os dois solos foi considerada significativamente diferente em termos estatísticos e influenciou a composição das amostras de azeite, havendo uma correlação positiva com o conteúdo nos compostos antioxidantes hidroxitirosol (HT) e tocoferol γ (Toc γ) e ainda com os ácidos gordos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2) e negativa com o ácido oleico (C18:1). De realçar o facto de o pH do solo ter sido o único valor a influenciar o teor do composto antioxidante tocoferol γ nas amostras de azeite analisadas, o que poderá estar relacionado com o acentuar do stress ambiental das oliveiras perante a indisponibilidade de grande parte dos nutrientes (já naturalmente em quantidade deficitária) no olival conduzido em modo de produção biológico (solo alcalino).

Outro resultado curioso foi a relação cálcio/magnésio (Ca/Mg). A maior parte dos autores consultados avalia normalmente o efeito individual da variação de cada nutriente; no entanto Erel *et al* (2013) referem que não se podem menosprezar as interações entre elementos, pois podem haver fortes correlações entre alguns deles. Assim, embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas no teor de individual de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) para os dois solos (ver tabela 6.7), o valor foi considerado elevado para ambos os micronutrientes e para ambos os solos (o solo conduzido em modo de produção convencional apresentou um teor médio de 20,6 meq/100g de cálcio e 3,29 meq/100g de magnésio e o solo conduzido em modo de produção biológico um conteúdo em cálcio de 24,3 meq/100g e em magnésio de 3,19 meq/100g), a relação entre eles mostrou uma correlação positiva com o conteúdo em compostos fenólicos totais (CFT) dos azeites virgens. Apesar de o valor desta relação nos dois solos não ter sido significativamente diferente e poder ser considerada adequada por Medeiros *et al* (2008) para o solo conduzido em modo de produção convencional (6,30) e ligeiramente elevada para o solo conduzido em modo de produção biológico (8,47) (os autores consideram uma relação adequada quando os valores variam entre 4,1 e 8,1), foi, no entanto, considerada elevada no solo conduzido em modo de produção convencional e muito elevada para o solo conduzido em modo de produção biológico pelo laboratório C+E Analítica, S.L., e foi o único valor, entre todos os analisados nos solos, que apresentou uma correlação com o conteúdo em compostos fenólicos totais dos azeites (CFT), tendo as amostras de azeite biológico

apresentado um teor superior de CFT. De referir ainda a opinião de Mousavi (2011) que afirma que um alto teor de magnésio (Mg) como o verificado nos solos em análise, diminui a disponibilidade de manganês (Mn) e Medeiros (2008) que concluiu que, num ensaio realizado com milho, a elevada concentração de cálcio no solo inibiu a absorção de magnésio (Mg) e potássio (K) pelas plantas.

6.4 – CONCLUSÕES

Após o acompanhamento da maturação e caracterização química de todas as amostras de azeite virgem extraído de azeitonas da cultivar Cordovil de Serpa, em olivais conduzidos em modo de produção biológico e modo de produção convencional pode concluir-se que as azeitonas produzidas em modo de produção convencional apresentaram valores mais baixos nas análises respeitantes à classificação geral de um azeite virgem: percentagem de acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos (K232 e K270). Estes resultados devem-se ao facto de as azeitonas produzidas em modo de produção biológico terem tido um amadurecimento mais acelerado, alcançando um valor muito elevado de índice de maturação de Jaen, no final do ensaio. Além disso, as azeitonas produzidas em modo de produção convencional são adubadas e tratadas fitosanitariamente, pelo que estão mais protegidas da degradação.

Em relação ao teor de antioxidantes naturais: compostos fenólicos totais, tirosol, hidroxitirosol e tocoferóis α e γ , os azeites biológicos apresentaram valores consideravelmente superiores em relação ao azeite convencional. Verificou-se ainda que a evolução destes compostos durante a maturação não estará tão relacionada com a cor dos frutos (medida pelo índice de Jaen), como geralmente se supõe, mas sim com a época de colheita das azeitonas, uma vez que, nas amostras de azeite em estudo, o valor máximo dos compostos fenólicos totais foi atingido na mesma data para as azeitonas de ambos os modos de produção e, no entanto, apresentavam um índice de maturação diferente. Foi também nesta data que ambos os azeites apresentaram a mais elevada estabilidade oxidativa, medida pelo rancimat.

Em relação à composição em ácidos gordos também se observaram diferenças consideráveis nos azeites obtidos. Assim, as amostras de azeite obtidas em modo de produção convencional apresentaram um teor de ácido oleico significativamente superior e um conteúdo em ácido linoleico bastante inferior em relação às amostras de azeite biológico.

Assim, e uma vez que a evolução da maturação das azeitonas em modo de produção biológico foi mais acelerada, deverá ter-se mais cuidado no controlo da qualidade dos frutos no olival, para garantir a obtenção de azeites virgem extra e potenciar a mais valia qualitativa do elevado conteúdo em antioxidantes, junto do consumidor.

As referências citadas neste ensaio parecem indiciar que o conhecimento actual relacionado com o efeito da nutrição mineral nas características e qualidade do azeite virgem é limitada e inconsistente. As diferentes conclusões encontradas nos trabalhos referidos na bibliografia podem ter várias explicações. Uma das razões podem ser as diferenças entre modos de produção, para os quais existem importantes diferenças na disponibilidade e uniformidade dos nutrientes. Isto é especialmente verdade quando se comparam olivais de sequeiro ou regadio (Bar-Yosef, 1999). Outro factor potencialmente complicador é a dependência da resposta da oliveira à nutrição mineral em aspectos como: tipo de solo (Erel *et al*, 2013), quantidade de frutos (Beltrán *et al*, 2004) e clima. No entanto, talvez a razão mais importante para a divergência de resultados encontrados na bibliografia em relação à nutrição mineral seja o modo como a fertilização é feita e que inclui a composição do fertilizante, o método de aplicação, calendário de aplicação, propriedades físicas e químicas do solo, nível nutricional da árvore e condições ambientais. Em particular a disponibilidade em água é indispensável na determinação da resposta da planta aos minerais (Marschner, 1995). A análise de todos estes factores é complexa e o objectivo de determinar a origem de um azeite virgem a partir da análise do solo onde está implantado o olival que lhe deu origem parece demasiado otimista uma vez que, para além dos factores mencionados como por ex^o a resposta da aplicação de um determinado nutriente na composição do azeite, ainda é preciso considerar as interações que existem entre os vários nutrientes pois, o excesso ou deficiência de um deles pode afectar a

disponibilidade de outro e sendo ainda, este equilíbrio entre nutrientes muito dependente do valor do pH e o teor de matéria orgânica do solo.

Após realização deste ensaio pode, no entanto, concluir-se que, à semelhança dos resultados referidos na maioria da bibliografia consultada, os azeites virgens oriundos do olival conduzido em modo de produção biológico apresentam para o ano em estudo e em igualdade de outros factores como características edafo-climáticas, cultivar de azeitona, estado de maturação dos frutos e método de extração do azeite, um teor em compostos fenólicos e tocoferóis superior aos azeites virgens obtidos no olival conduzido em modo de produção convencional. Este facto pode estar relacionado com o stress ambiental das oliveiras, em condições de deficiência de nutrientes uma vez que, de acordo com a tabela 6.7 se verificou haver uma correlação maioritariamente negativa entre o teor de nutrientes do solo e a composição nos antioxidantes analisados nas diferentes amostras de azeite virgem. Como refere Dag *et al* (2009) uma possível justificação seria a activação, em situações de stress da oliveira, da enzima fenilalanina amónia liase, que catalisa a síntese da grande maioria dos compostos fenólicos.

Em relação à composição dos azeites virgens nos principais ácidos gordos: palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), conclui-se que também estes compostos são consideravelmente influenciados pela composição mineral do solo. No entanto, neste ensaio obteve-se um resultado contrário aos autores consultados, o que pode ser justificado pelas diferenças nas cultivares de azeitona estudadas e/ou diferenças em condições ambientais como tipo de solo e clima, uma vez que o nível óptimo de nutrientes, que influencia tanto a quantidade como a composição do azeite virgem, é específico para cada cultivar. Como levemente sugerido por Erel *et al* (2013), pode levantar-se assim a questão da provável existência de um mecanismo sinérgico único na aquisição de nutrientes por parte das diferentes cultivares que influencie a actuação das enzimas que intervêm na biossíntese dos ácidos gordos. De realçar que estes resultados foram obtidos em uma campanha pelo que será necessário prolongar os ensaios por outras campanhas, com outras cultivares e diferentes condições edafo-climáticas e mesmo em relação a outros modos de produção como os actuais olivais super-intensivos para se poderem validar estes resultados que sugerem que os azeites

virgens biológicos, normalmente obtidos em olivais sujeitos a condições de stress nutricional, terão um conteúdo superior em antioxidantes e inferior em ácido oleico.

Concluindo, verificou-se que o modo de produção das azeitonas influencia a quantidade e qualidade dos compostos antioxidantes e o perfil dos ácidos gordos formados durante a maturação. De realçar o facto de o conteúdo de tocoferol β do azeite ter sido apenas influenciado pelo teor de boro (B) do solo (correlação negativa) e o conteúdo em tocoferol γ pelo valor de pH (correlação positiva). Ainda mais marcante o facto de o conteúdo em compostos fenólicos totais (CFT) ser apenas influenciado pela relação cálcio/ magnésio (Ca/ Mg) do solo (correlação positiva) e esta relação não estar relacionada com mais nenhum composto do azeite. Assim e, uma vez que se mantiveram praticamente constantes todos os outros fatores que determinam a composição de um azeite, estes compostos poderão ser usados futuramente numa base de dados como marcadores para diferenciar azeites virgens de acordo com o modo de produção e origem geográfica.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÃO

O interesse dos consumidores por produtos alimentares de alta qualidade com uma origem geográfica bem definida tem aumentado nos últimos anos.

A caracterização dos azeites virgens monovarietais ou elementares europeus está hoje bem definida e existe informação suficiente sobre os diferentes fatores que influenciam a sua composição química e os seus atributos sensoriais. Existem, assim, explicações plausíveis para os valores dos parâmetros analisados, baseados no clima, no solo, no estado de maturação das azeitonas, na tecnologia e condições utilizadas na extração do azeite, entre muitos outros. Os olivicultores têm hoje a possibilidade de escolher as cultivares mais adequadas para uma determinada área geográfica, decidir a data ótima de colheita das azeitonas e preparar os melhores lotes com diferentes cultivares para satisfazer clientes particulares.

A informação sobre azeites virgens elementares permite também aumentar as bases de dados de azeites monovarietais e, conseqüentemente, conseguir uma melhor caracterização das Denominações de Origem Protegida (DOP) e a determinação da origem geográfica dos azeites embalados. Estes aspetos, relacionados com a autenticação, protegem os azeites virgens das adulterações e de uma rotulagem inadequada.

O controlo da rotulagem dos azeites virgens, em relação à sua origem geográfica, é hoje uma das prioridades, tanto dos produtores como das autoridades nacionais e europeias de combate à fraude. A não existência de uma metodologia precisa e rápida que permita detetar a origem geográfica e a crescente importância económica dos produtos DOP e IGP, desafiam os investigadores a encontrar novos procedimentos analíticos que permitam a rastreabilidade dos azeites virgens. Não existe um composto individual na composição do azeite que esteja diretamente relacionado com a sua origem geográfica, mas todos eles são parcialmente afetados pela área onde crescem as azeitonas que lhes deram origem.

Da análise dos dois ensaios descritos, pode concluir-se que, de acordo com o referido ao longo deste trabalho, também nestes casos o teor em antioxidantes e o perfil de

ácidos gordos das amostras analisadas nos fornecem informações úteis para a rastreabilidade dos azeites virgens elementares alentejanos, mais concretamente para os azeites extraídos das cultivares Galega vulgar e Cordovil de Serpa, a primeira presente nas três DOP de azeite do Alentejo e a segunda nas DOP Azeite de Moura e Azeite do Alentejo Interior.

Assim, em relação à composição em ácidos gordos, verifica-se que é possível distinguir o azeite extraído da cultivar Galega vulgar dos azeites obtidos das outras cultivares analisadas, e mesmo dos azeites extraídos de cultivares tradicionais de outras regiões do mundo, devido ao seu mais elevado teor em ácido palmítico e palmitoleico e menor teor em ácido linoleico. Esta composição particular manteve-se nos três ensaios realizados, independentemente do ano de colheita, do modo de produção, do estado de maturação e da região de origem. Não é, no entanto, possível utilizar apenas um destes ácidos gordos como marcador na rastreabilidade do azeite, uma vez que existem cultivares como a Arbequina, de origem espanhola mas atualmente muito cultivada em Portugal, que também possui um teor de ácido palmítico e palmitoleico semelhante ao da cultivar Galega vulgar; tem, no entanto um conteúdo muito mais elevado em ácido linoleico pelo que se deverá utilizar também a relação entre os ácidos gordos monoinsaturados e os ácidos gordos polinsaturados (AGMI/AGPI) como complemento da rastreabilidade dos azeites virgens. Os azeites extraídos da cultivar Galega vulgar apresentaram uma relação AGMI/AGPI mais elevada que os outros, sendo esta a principal razão da sua grande resistência à degradação oxidativa durante o armazenamento. No que respeita à composição em antioxidantes naturais, a cultivar Galega vulgar apresenta um baixo teor em compostos fenólicos totais; verificou-se no entanto uma tendência para ter um teor mais elevado em tocoferol γ quando comparado com outras cultivares consultadas na bibliografia.

Quando se pretende fazer a rastreabilidade geográfica dos azeites virgens provenientes da cultivar Galega vulgar com base no seu perfil ácido, ou seja, para a mesma cultivar, tentar determinar a origem do azeite em relação à sua composição relativa em ácidos gordos, verifica-se que os azeites extraídos da cultivar Galega vulgar no sul do país, essencialmente no Baixo Alentejo, concelhos de Beja e Moura, se separam dos extraídos no norte do país, nos concelhos de Celorico da Beira e Viseu,

por possuírem um teor inferior em ácido oleico e mais elevado em ácido palmítico e palmitoleico. Assim, de acordo com os resultados obtidos no ensaio realizado, parece poder concluir-se que, para esta cultivar, a insaturação do azeite tende a aumentar com a latitude, o que será um parâmetro importante a ter em conta na base de dados que futuramente se considerar construir afim de possibilitar a rastreabilidade geográfica dos azeites elementares alentejanos.

Os azeites oriundos da margem esquerda do rio Guadiana gozaram sempre de uma fama que já vem de há muitos séculos, pelo menos desde a romanização da Península Ibérica. Assim, para confirmar esta realidade, restringiu-se a área em análise ao Alentejo, diferenciando apenas a origem geográfica do azeite entre as duas margens do rio. Verificou-se que, para os azeites extraídos da cultivar Galega vulgar, não existem, para uma área tão pequena, diferenças significativas em relação à composição em ácidos gordos. No entanto, neste ensaio, as amostras de azeite virgem obtidas na margem esquerda do rio Guadiana apresentaram um conteúdo superior em compostos fenólicos totais, hidroxitirosol e também em clorofila pelo que são azeites um pouco mais amargos e picantes e com uma coloração verde mais acentuada.

Em relação à composição mineral dos solos, verificou-se que alguns elementos presentes nos solos dos olivais foram também detetados nos azeites virgens obtidos das oliveiras aí plantadas, embora em concentrações mais baixas. Concluiu-se que os azeites virgens obtidos nas freguesias de S. João Baptista e Sto. Agostinho (freguesias geograficamente próximas) pertencentes ao concelho de Moura, apresentaram uma composição elemental muito semelhante, o que será muito positivo na determinação da origem geográfica dos azeites. De um modo geral verificou-se também uma relação próxima entre a composição elemental de alguns solos analisados e a dos respectivos azeites; a relação foi particularmente próxima para a freguesia de S. Brissos no concelho de Beja.

Em relação à cultivar Cordovil de Serpa, observa-se que também apresentou uma considerável constância em relação ao perfil de ácidos gordos. Assim, os azeites extraídos desta cultivar em Portugal caracterizam-se por conterem um elevado conteúdo em ácido oleico e, simultaneamente, baixo em ácido linoleico, quando

comparados com os valores encontrados na bibliografia para outras cultivares, o que lhes confere uma boa relação AGMI/AGPI. Foi objetivo, para esta cultivar, verificar a existência de diferenças na composição dos azeites extraídos ao longo da maturação com o modo de produção (biológico e convencional), em amostras obtidas na mesma região. Concluiu-se que as azeitonas produzidas em modo biológico amadureceram mais rapidamente do que as produzidas em modo convencional, o que originou azeites com índices de qualidade geral inferior. Em relação à composição em ácidos gordos o modo de produção influenciou a composição ácida dos azeites, sendo o biológico mais insaturado do que o convencional e também a composição em antioxidantes naturais sendo, neste caso, o azeite biológico mais rico em compostos fenólicos totais e também em tocoferóis α e γ , para o ano em estudo e em igualdade de outros factores como características edafo-climáticas, cultivar de azeitona, estado de maturação dos frutos e método de extração do azeite.

Este facto pode estar relacionado com o stress ambiental das oliveiras, em condições de deficiência de nutrientes uma vez que em situações de stress da oliveira, a enzima fenilalanina amónia liase é activada, catalisando a síntese da grande maioria dos compostos fenólicos.

Em termos gerais, tendo em conta todas as análises realizadas nos dois ensaios, como conclusão geral do trabalho, pode-se afirmar que não se encontrou uma relação direta entre a composição em compostos fenólicos totais e o estado de maturação das azeitonas, medido pela cor dos frutos. De facto, o teor máximo destes compostos parece estar mais relacionado com uma determinada época ou data, uma vez que, durante os ensaios realizados, azeites extraídos de azeitonas com índices de maturação diferentes, atingiram o conteúdo máximo de compostos fenólicos totais na mesma data. Do mesmo modo não se encontrou uma relação direta entre a estabilidade dos azeites, medida pela resistência à degradação oxidativa, e o conteúdo em compostos fenólicos totais, parecendo haver uma ação sinérgica entre diferentes compostos do azeite.

Finalmente, confirmou-se ser a origem geográfica o fator com mais peso na diferenciação da composição em ácidos gordos de um azeite, pelo que será esta

composição relativa, um marcador importante na rastreabilidade dos azeites virgens elementares, uma vez que também pouco se altera durante o armazenamento e comercialização após a extração. No entanto, se eliminarmos a influência da região (ensaio 2), verifica-se que, nessa circunstância, o modo de produção poderá ajudar a diferenciar azeites extraídos da mesma cultivar, quando se pretender confirmar se o azeite foi extraído de azeitonas produzidas em modo de produção biológico ou convencional.

A maior parte das análises realizadas neste trabalho, em cada um dos ensaios, foram efetuadas durante uma campanha específica e em condições determinadas, pelo que será necessário, em futuros trabalhos, repetir os ensaios com outras amostras e em outras campanhas para se confirmarem os resultados aqui obtidos. A época de colheita da azeitona é um ponto crítico e a composição química de um azeite pode variar consideravelmente de ano para ano, uma vez que o efeito da maturação no conteúdo em antioxidantes do azeite depende das interações com o ano da colheita, sendo necessário estudar o efeito das alterações sazonais em diferentes campanhas.

Uma vez estabelecida esta relação, poderá adicionar-se toda a informação até agora recolhida numa base de dados obtendo-se, então, uma ferramenta de extrema utilidade na determinação da origem e caracterização dos azeites virgens elementares alentejanos.

BIBLIOGRAFIA

Aguilera, M. P.; Beltrán, G.; Ortega, D.; Fernández, A.; Jiménez, A. e Uceda, M. (2005). Characterization of virgin olive oil of italiano live cultivars “Frantoio” and “Leccino” grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89: 387 – 391.

Alba, J.; Izquierdo, J. R.; Gutiérrez, F.; (1997). *Aceite de oliva virgen. Análise sensorial*. 2ª Edición, Editorial Agrícola Española, S. A. Madrid.

Alcubilla, M.; Garcia, M., Romero, M.; Espada, J.; Beltrán, J. (2002). Fertilización nitrogenada en el olivo cv. Empeltre II. Composición polifenólica de hojas y frutos y calidad del aceite. Comunicaciones ai IX Simposio Ibérico sobre nutrición mineral de las plantas. Institución Fernando el Católico: Zaragoza, Spain. pp 233 – 246.

Allalout, A.; Krichène, D.; Metheni, K.; Taamali, A.; Oueslati, I.; Daoud, D. e Zarrouk, M. (2009). Characterization of virgin olive oil from super intensive spanish and greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120: 77 – 83.

Alonso, M. V. e Aparicio, R. (1993). Characterization of European virgin olive oils using fatty acids. *Grasas e Aceites*, 44: 18 – 24.

Anastasopoulos, E.; Kalogeropoulos, N.; Kaliora, A.; Kountouri, A. (2011). The influence of ripening and crop year on quality índices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 170 – 178.

Angerosa, F.; Mostallino, R.; Basti, C. e Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*: 68: 283 – 287.

Aparício, R.; Luna, G. (2002). Characterization of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 614 – 627.

Aparício, R.; Roda, R.; Albi, M. A. e Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 4150 – 4155.

Arvanitoyannis, I. S. e Vlakos A. (2007). Implementation of Physicochemical and Sensory Analysis in Conjunction with Multivariate analysis towards Assessing Olive Oil Authentication/Adulteration. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(5): 441 – 498.

Arslan, D.; Karabekir, Y. e Schreiner, M. (2013). Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, 54: 1897 – 1906.

Ayton, J.; Rodney, J. e Graham, K. (2012). The effect of storage conditions on extra virgin olive oil quality. *Australian Government – Rural Industries Research and Development Corporation*, RIRDC Publication No. 12/024.

Baccouri, B.; Zarrouk, W.; Krichene, D.; Nouairi, I.; Youssef, N.; Daoud, D. e Zarrouk, M. (2007). Influence of fruit ripening and crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected oleasters (*Olea europea* L.). *Journal of Agronomy*. 6(3): 388 – 396.

Baccouri, O.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Lercker, G.; Zarrouk, M. e Miled, D. D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109: 743 – 754.

Baccouri, O.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Lercker, G.; Zarrouk, M.; Miled, D. (2008). Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry*, 111: 322 – 328.

Baer, I. (2006). *Contribuição para o estudo da degradação oxidativa de azeites virgens provenientes das cultivares Cordovil de Serpa, Galega vulgar e verdeal alentejana*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.

Baer, I.; Patanita, M. (2014). *Azeite Virgem*. Brochura publicada no âmbito do projecto I2TEP – Investigación y Transferencia Transfronteriza España-Portugal. Sub-projecto OLITRACE 2 – Estudio de la trazabilidad integral de los aceites de oliva virgenes del Suroeste Ibérico.

Bakhouché, A.; Lozano-Sánchez, J.; Beltrán-Debón, R.; Joven, J.; Segura-Carretero, A. e Fernández-Gutérrez, A.; (2013). Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in Southern Catalonia. *Food Research International*, 50: 401 – 408.

Bar-Yosef, B. (1999). Advances in fertigation. *Advances in Agronomy*, 65: 1 – 77.

Barranco, D.; Fernández-Escobar, R. e Rallo, L.; (1999). *El cultivo del Olivo*. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Beltrán, G.; del Rio, C.; Sánchez, S.; Martínez, L. (2004). Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv Picual. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 52: 3434 – 3440.

Beltrán, G.; Aguilera, M. P.; Del Rio, C.; Sanchez, S. e Martinez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89: 207 – 215.

Ben Temime, S.; Baccouri, B.; Taamali, W.; Abaza, L.; Daoud, D. e Zarrouk, M. (2006). Location effects on oxidative stability of Chétoui virgin olive oil. *Journal of Food Biochemistry*, 30: 659 – 670.

Benincasa, C.; Lewis, J.; Perri, E.; Sindona, G. e Tagarelli, A. (2007). Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 585: 366 – 370.

Benitez-Sánchez, P.; Camacho, L.; Aparicio, R. (2003). A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *European Food Research Technology*, 218: 13 – 19.

Blekas, G.; Tsimidou, M. e Boskou, D. (1995). Contribution of α -tocopherol to olive stability. *Food Chemistry*, 52: 289 – 294.

Blekas, G.; Psomiadou, E.; Tsimidou, M. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science Technology*, 104: 340 -346.

Boskou, D. (2006). *Polar phenolic compounds*. In: Olive Oil: Chemistry and Technology. Edition American Oil Chemistry Society, USA, 73 – 92.

Breton, C.; Claux, D.; Metton, I.; Skorski, G. e Bervillè, A. (2004). Comparative Study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify Cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible Forensic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3): 531 – 537.

Bullota, S.; Celano, M.; Lepore, S.; Montalcini, T.; Pujia, A.; Russo, D. (2014). Beneficial effects of olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, 12: 219

Canabate-Díaz.; Carretero, A.; Fernández-Guttiérrez, A.; Belmonte, A.; Garrido, A.; Martínez, J.; Duran, J. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, 102: 593 – 598.

Cardoso, S.; Falcão, S.; Peres, A. M. e Domingues, M. (2011). Oleuropein/ligstroside isomers and their derivatives in Portuguese olive mil wastewaters. *Food Chemistry*, 129(2): 291 – 296.

Carrasco-Pancorbo, A.; Gomez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Cerretani, L.; Bendini, A. e Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12): 2144 – 2155.

Casa do Azeite – Associação do Azeite de Portugal (2013). Acedido a 15 de Março de 2013, em www.casadoazeite.pt.

CEPAAL – Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo (2013). Acedido em 25 de Março de 2013 em www.azeitesdoalentejo.com

Cerqueira, F. M; Medeiros, M. H. e Augusto, O. (2007). Dietetic antioxidants: controversies and perspectives. *Quimica Nova*, 30(2)

Cerretani, L.; Salvador, M. D.; Bendini, A. e Fregapane, G. (2008). Relationship between sensory evaluation performed by Italian and Spanish official panels and volatile and phenolic profiles of virgin olive oils. *Chemosensory Perception*, 1: 258 – 267.

Cinquanta, L.; Esti, M. e Matteo, M. (2001). Oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 78(12): 1197 – 1202.

COI - Conselho Oleícola Internacional (2000). *Catálogo Mundial de Variedades de Olivo*. Consejo Oleícola Internacional, Madrid.

COI - Conselho Oleícola Internacional (2012). Standards and Guides. *Olivae*, 117: 35 – 42.

Conceição, A.; Gouveia, C.; Vitorino, M.; Henriques, L. e Peres, M. (2003). Azeite Galega Vulgar: evolução sensorial durante a maturação na campanha 2000/01. *Actas Portuguesas de Horticultura*, nº 13: 221 – 226.

Conde, C.; Delrot, S.; Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1545 – 1562.

CONFAGRI – Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal, CCRL (2013). Acedido a 10 de Novembro de 2013 em www.confagri.pt.

Costa, M. N. (2012). *Caracterização de azeites provenientes de azeitonas com diferentes estados de maturação*. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Beja, Beja.

Covas, I. Ruiz-Gutierrez, V.;Rafael de la Torre, A.; Kafatos, R.; Lamuela-Ravento, S.; Jesus, R.; Owen, W.; Visioli, F. (2006) Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans *Nutrition Reviews*, 64(9): S1 –S11.

Covas, I. (2008). Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology*, 16: 216 – 218.

Curci, V. (2001). Caratteristiche dell'oliva. In: *Manuale dell'olio d'oliva*. Edagricole – Edizioni Agricole della Società Gruppo Calderini Edagricole. pp. 31 – 43.

Dabbou, S.; Chehab, H.; Brahmi, F.; Taticchi, A. e Servilli, M. (2011). Chemical composition of virgin olive oils from koroneiki cultivar grown in Tunisia with regard to fruit ripening and irrigation regimes. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 577 – 585.

Dag, A.; Ben-David, E.; Kerem, Z.; Ben-Gal, A.; Erel, R.; Basheer, L.; Yermiyahu, U. (2009). Olive oil composition as a function of nitrogen, phosphorus and potassium plant nutrition. *Journal of Science and Food Agriculture*, 89: 1871 – 1878.

Dagdelen, A.; Tümen, G.; Özcan, M. M. e Dündar, E. (2012). Determination of tocoferol contents of some olive varieties harvested at different ripening periods. *Natural Product Research*, 26(15): 1454 – 1457.

Dagdelen, A.; Tümen, G.; Özcan, M. M. e Dündar, E. (2013). Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europea* L.) and oils from Ayvalik, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages. *Food Chemistry*, 136: 41 – 45.

Deiana, M.; Rosa, A.; Cao, C.; Pirisi, F.; Bandino, G.; Dessi, A. (2002). Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils : importance of α -tocopherol concentration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 4342 – 4346.

D'imperio, M.; Dugo, G.; Alfa, M.; Mannina, L. e Segre, A.L. (2007). Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102: 956 – 965.

Erel, R.; Kerem, Z.; Ben-Gal, A.; Dag, A.; Schwarz, A.; Zipori, I.; Basheer, L.; Yermiyahu, U. (2013). Olive (*Olea europea* L.) tree nitrogen status is a key factor for olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. pp A – L

Escuderos, M.; Sayago, A.; Morales, M. T. e Aparicio, R. (2009). Evaluation of α -tocopherol in virgin olive oil by a luminescent method. *Grasas e Aceites*, 60(4): 336 – 342.

Esmaeili, A.; Shaykhmoradi, F.; Naseri, R. (2012). Comparison of oil content and fatty acid composition of native genotypes in different region of Lian, Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(8): 434 – 438.

Estie, M.; Cinquanta, L. e Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 32 – 35.

Fernández-Escobar, R.; Béltran, G.; Sanchez-Zamora, M.; Garcia-Novelo, J.; Aguilera, M.; Uceda, M. (2006). Olive oil quality decreases with nitrogen over-fertilization. *Hortscience*, 41: 215 – 219.

Fernández-Escobar, R.; Marin, L.; Sánchez-Zamora, M.; Garcia-Novelo, J.; Molina-Soria, C.; Parra, M. (2009). Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile. *European Journal of Agronomy*, 31: 223 – 232.

Ferreira, D. J.B. (2010). *O olival em modo de produção biológico: custos e rentabilidade na região de Moura, Alentejo*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Fiorino, P.; Alessandri, S.; Cert, A.; Dikmen, L.; Rahmani, M. (1996). *Técnicas agronómicas y características del aceite de oliva*. In: La Enciclopedia del Olivo; COI Plaza & Janés: Barcelona, Spain. pp 195 – 222.

Inglese, P.; Gullo, G.; Pace, L. (2002). Fruit growth and olive oil quality in relation to foliar nutrition and time of application. *Acta Hortícola*, 586: 507 – 509.

Freitas, D. C. (2013). *Caracterização fenólica de azeites virgens provenientes da cultivar Galega vulgar e validação do método por HPLC*. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico de Beja, Beja.

Gabinete de Planeamento e Políticas (2013). Acedido a 30 de Setembro de 2013 em www.gpp.pt.

Gama, J. P. (2002). *Contribuição para a caracterização dos azeites elementares do Alentejo*. Tese de Licenciatura. Instituto Politécnico de Beja, Beja.

Gámbaro, A.; Raggio, L.; Ellis, A.; Amarillo, M. (2014). Virgin olive oil color perceived quality among consumers in emerging olive-growing countries. *Grasas y Aceites*, 65 (2): 1 – 8.

Gandul-Rojas, B. e Minguéz-Mosquera, M. I. (1999). Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils from Various Spanish Olive Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1): 31 – 39.

García, A.; Brenes, M.; Romero, C.; García P. e Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the picual variety. *European Food Research and Technology*, 215: 407 – 412.

García-González, D.; Luna, G.; Morales, M. T. e Aparicio, R. (2009). Stepwise geographical traceability of virgin olive oils by chemical profiles using artificial neural network models. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 1003 – 1013.

Gardner, W. P. (1997). *Statistical Analysis Methods for Chemists. A software-based approach*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.

Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.; Gilani, A.; Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europea* L.) – A Review. *International Journal of molecular Sciences*, **13**: 3291 – 3340.

Gharby, S.; Harhar, H.; Kartah, B.; Chafchauni, I.; Sibawayh, Z. e Charrouf, Z.(2013). Chemical Characterization and oxidative stability of two monovarietal virgin olive oils (Moroccan Picholine and Arbequina) grown in Morocco. *Journal of Material Environmental Science*, **4 (6)**: 935-942.

Gimenez, M. J.; Pistón, F.; Martín, A. e Atienza, S. G. (2010). Application of real time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chemistry*, **118**: 482 – 487.

Giovacchino, L.; Sestili, S. e Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**: 287 – 601.

Gómez-Rico, A.; Inarejos-García, A. M.; Salvador, M. D.; e Fregapane, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and

corresponding virgin olive oils (*Olea europea* L. Cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3587 – 3595.

Gouveia, J. M. B. (1995). *Azeites virgens do Alto Alentejo – comportamento químico, tecnológico e sensorial*. Tese de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Gouveia, J. M. B. (1996). IX Curso Internacional sobre a melhoria da qualidade do azeite. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 9 – 13 de Dezembro.

Gouveia, J. M. B. (2011). A diferenciação dos azeites pelas variedades. Encontro Ibérico dos Azeites. Abrantes.

Grob, K.; Landfranchi, M.; Mariani, C. (1990). Evaluation of olive oils through the fatty alcohols , the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 67: 626 – 634.

Gurdeniz, G.; Ozen, B. e Tokatli, F. (2008). Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *European Food Research and Technology*, **227**: 1275 – 1281.

Gutiérrez, F.; Arnaud, T. e Garrido, A. (2001). Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **81**: 1463 – 1470.

Gutiérrez, F. e Fernández, J. (2002). Determinant parameters and componentes in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of “extra” quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 571 – 577.

Haddada, F.; Krichéne, D.; Manai, H.; Oueslati, I.; Daoud, D. e Zarrouk, M. (2008). Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**: 905 – 913.

Harwood, J. e Aparicio, J. R. (2000). *Handbook of Olive Oil – Analysis and Properties*. An Aspen publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Henriques, L.; Peres, M.; Vitorino, M.; Pinheiro-Alves, M. e Simões, P. (2000). Estabilidade relativamente à oxidação de azeites monovarietais da Beira Baixa. *Revista de Ciências Agrárias*.

Henriques, L.; Peres, M.; Vitorino, M.; Pinheiro-Alves, M. e Simões, M. (2001). Estabilidade relativamente à oxidação de azeites monovarietais da Beira Baixa. Acedido em Março de 2013 no repositório científico do IPCB: <http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/1102/1/Estabilidade%20relativamente%20a%20oxida%C3%A7%C3%A3o.pdf>

Hermoso, M.; Uceda, M.; Frias, L. e Beltrán, G. (1999). Maduración. In: *El Cultivo del Olivo*. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 151 – 167.

Herrera, M. (2013). *Estudio de la composición fenólica del aceite de oliva virgen extra: caracterización y reactividad antioxidante*. Tese de Doutoramento. Universidade de Huelva, Huelva.

Japon-Lujan, R.; Ruiz-Jimenez, J. e Castro, M. D. (2006). Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9706 – 9712.

Jiménez, B.; Sánchez-Ortiz, A.; Lorenzo, M. L. e 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(2): 1860 – 1867.

Jones, L. e Atkins, P. (1999). *Chemistry: molecules, matter and change*. 4ª edição, V. H. Freeman and Company. New York.

Kalua, C.M.; Allen, M.S.; Bedgood D. R.; Bishop, A. G.; Prenzler, P. D. e Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chemistry*, 100: 273 – 286

Kamal-Eldin, A.; Appelqvist, L. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols *Lipids*, 31: 671 – 701.

Karabagias, I.; Michos, Ch.; Badeka, A.; Kontakos, S.; Stratis, I.; Kontominas, M. (2013). Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based

on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. *Food Research International*, 54: 1950 – 1958.

Kiritsakis, A. K. (1992). *El Aceite de Oliva*. Madrid Vicente Ediciones, Madrid.

Kiritsakis, A. K. e Christie, W. W. (2000). Analyses of edible oils. In: *Handbook of olive oil: analyses and properties*. J. Harwood e R. Aparicio (Ed). Aspen Publications. pp. 129 – 158.

Kiritsakis, A. K. e Christie, W. W. (2003). Análises de aceites comestibles. In: *Manual del Aceite de Oliva*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 135 – 162.

Landete, J. (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52: 936 – 948.

León, L.; Uceda, M.; Jiménez, A.; Martín, L.; Rallo, L. (2004). Variability of fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L.) progenies. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3): 353 – 359.

Llorent-Martinez, E.; Ortega-Barrales, P.; Fernández-de Córdoba, M.; Domínguez-Vidal, A.; Ruiz-Medina, A. (2011). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*, 127: 1257 – 1262.

López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; Badimón, L.; Covas, M.; Escrich, E.; Ordovàs, J.; Osada, J.; Panagiotakos, D.; Peinado, M.; Poulsen, H.; Ramírez-Tortosa, M.; Ruano, J.; Solfrizzi, V.; Uceda, M.; Visioli, F. (2010). Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, xx: 1 – 11.

Lorenzo, I.; Pavon, J.; Laespada, M.; Pinto, C.; Cordero, B. (2002). Detection of adulterants in olive oil by headspace mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 945: 221 – 230.

Liu, C. W.; Lin, K. H. e Kuo, Y. M. (2003). Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a Blackfoot disease area in Taiwan. *Science of the Total Environment*, 313: 77 – 89.

Luykx, D. M. A. M. e Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2): 897 – 911.

Mailer, R.; Corian, D. e Ayton, J. (2005). Olive harvest – Harvest timing for optimal olive oil quality. *Rural Industries Research and Development Corporation Publications*, nº 5/013 RIRDC Project nº DAN – 197 A.

MAMAOT/GPP – Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território/ Gabinete de Planeamento e Políticas. (2013). *Azeitona laborada e azeite extraído pelos lagares/ por região – campanha 2011/ 12*. MAMAOT/ GPP. Lisboa.

Mansinho, M. e Fontes, M. (2007). Um azeite novo no mercado – Azeite monovarietal de azeitona Galega. *Sulco*, Outono: 24.

Marini, F.; Balestrieri, F.; Bucci, R.; Magri, A. D.; Magri, A. L. e Marini, D. (2004). Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 73: 85 – 93.

Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2 nd ed; Academic Press: London.

Matos, L. C.; Cunha, S. C.; Amaral, J. S.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M. e Oliveira, B. P. (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation índices. *Food Chemistry*, 102: 406 – 414.

Matteucci, M.; D’Angelli, S.; Errico, S.; Lamanna, R.; Perrota, G.; Altamura, M. (2011). Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europea* L. genotypes with different cold hardiness. *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3403 – 3420.

Mendoza, M. F.; Gordillo, C. M.; Expósito, J. M.; Casas, J. S.; Cano, M. M ; Vertedor, D. M. e Baltasar, M. N. (2013). Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chemistry*, 141: 2575 – 2581.

- Minguez-Mosquera, M.; Rejano-Navarro, L.; Gandul-Rojas, B.; Sánchez-Gómez, A. e Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-Pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists` Society*. 68: 332-226
- Montealegre, C.; Alegre, M. L. e Garcia-Ruiz, C. (2010). Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1): 28 – 38.
- Monteiro, A. M. (1999). *A Oliveira*. João Azevedo Editor. Mirandela.
- Montignac, M. (2001). Um óleo de grande virtude. In: *Azeite, um tesouro para o coração*. Edição Booktree, Sociedade Editorial, Lda. pp. 55 – 68.
- Morales-Sillero, A.; Jiménez, R.; Fernández, J. E.; Troncoso, A.; Beltrán, G. (2007). Influence of fertigation in “Manzanilla de Sevilla” olive oil quality. *Hortscience*, 42: 1157 – 1162.
- Newmark, H. (1999). Squalene, olive oil, and cancer risk: review and hypothesis. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 889: 193 – 203.
- Ninfalli, P.; Aluigi, G. e Bechioca, M. (2008). Antioxidant capacity of extra-virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 78(3): 243 – 246. A 3-year Study on Quality, Nutritional and Organoleptic Evaluation of Organic and Conventional Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (2): 151 - 158.
- Oueslati, I.; Anniva, C.; Daoud, D.; Tsimidou, M. Z. e Zarrouk, M. (2009). Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: the comercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry*, 112: 733 – 741.
- Ouni, Y.; Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. e Zarrouk, M. (2011). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC – ESI – TOF MS method. *Food Chemistry*, 127: 1263 – 1267.
- Owen, R.; Mier, R.; Giacosa, A.; Huli, W.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oils. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, 46(7): 976 – 988.

Owen, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.; Spiegelhalder, 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 and Chemical Toxicology*, 38: 647 – 659.

Paquete, M. (2009). *O azeite na cultura e no património alimentar*. 1ª edição. Colares Editora. Sintra.

Perri, E.; Benincasa, C. e Muzzalupo, I. (2012). Olive Oil Traceability. In: *Olive Germoplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. Chapter 13. pp. 265 – 286. Acedido a 20 de Dezembro de 2012 em <http://dx.doi.org>

Pires, A. C. (2012). *Azeite biológico vs Azeite convencional*. Tese de licenciatura, Instituto Politécnico de Beja, Beja.

Psomiadou, E. e Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81: 640–647.

Psomiadou, E.; Tsimidou, M. e Boskou, D. (2000). α -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1770 – 1775.

Qualifica – Associação Nacional de Municípios e de Produtores para a Valorização e Qualificação dos Produtos Tradicionais Portugueses (2013). Acedido em 15 de Abril de 2013 em www.qualifica.pt/index.php?go=scroll&pagina=produtos&tipo=0.

Quillez, J.; Garcila-Lorda, P.; Salas-Salvadol, J. (2003). Potential uses and benefits of phosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 22: 343 – 351.

Rabiei, Z. e Enferadi, S. T. (2012). Traceability of origin and authenticity of olive oil. In: *Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. pp. 163 – 183. Acedido a 17 de Setembro de 2013 em www.intechopen.com.

Ramalheiro, J. P. S. C. (2009). *Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Ranalli, A.; Contento, S.; Schiavone, C. e Simone, N. (2000). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 228 – 238.

Rapoport, H. (1998). Botanica y Morfologia. In: El cultivo del olivo. D. Barranco, R. Fernandez-Escobar e L. Rallo (Ed). Coedicion Junta de Andalucia e Ediciones Mundi-Prensa. pp. 36 – 60.

Regulamento (CEE) nº 2568/91 de 11 de Julho, anexo II. *Jornal Oficial da União Europeia* L 248. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CEE) nº 2568/91 de 11 de Julho, anexo III. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 248. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CEE) nº 2568/91 de 11 de Julho, anexo IX. *Jornal Oficial da União Europeia* L 248. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de Janeiro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 31. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 1989/2003 de 6 de Novembro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 295. 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) nº 834/2007, do Conselho de 28 de Junho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 189. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 1234/2007 de 22 de Outubro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 299. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 640/2008 de 4 de Julho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 178. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº 889/2008, de 5 de Setembro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 250. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (EU) nº 61/2011 de 24 de Janeiro, anexo I. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 23. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento de Execução (UE) nº 29/2012 de 13 de Janeiro. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 12. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Regulamento (UE) nº 432/2012 de 16 de Maio. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 136. Comissão Económica Europeia. Bruxelas.

Ribeiro, L. (2005). Caracterização química do aroma de azeites virgens com atributos positivos e negativos. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Caparica.

Román, R.; Amorós, J.; Reyes, C.; Navarro, F.; Bravo, S. (2014). Major and trace element content of olive leaves. *Olivae*, 119: 1 – 7.

Rondanini, D. P.; Castro, D. N.; Searles, P. S. e Rousseaux, M. C. (2011). Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites*, 62(4): 399-409.

Rotondi, A.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Mari, M.; Lercker, G. e Toschi, T. G. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3649 – 3654.

Rotondi, A.; Magli, M.; Morrone, L.; Alfei, B. e Pannelli, G. (2013). Italian National Database of monovarietal extra virgin olive oils. In: *The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive*, cap.8, pp. 179 – 200. Acedido a 13 de outubro de 2013 em <http://dx.doi.org/10.5772/51772>.

Ruiz, L.; Rodriguez, A.; Fernandez, M.; Marquez, A.; Pozo, M.; Bernardino, J.; Ayuso, M. e Ojeda, M. (1991). Analisis de aceituna. In: *Analistas de Laboratorio de Almazara*. Edição Direccion General de Investigacion y Extension Agrarias. Centro de Informacion y Documentacion Agraria, Sevilha. pp. 16 – 39.

Ruiz-Samblàs, C.; Tres, A.; Koot, A.; Ruth, S. M.; González-Casado, A. e Cuadros-Rodríguez, L. (2012). Proton transfer reaction-mass spectrometry volatile organic

compound fingerprinting for monovarietal extra virgin olive oil identification. *Food Chemistry*, 134: 589 – 596.

Salah, A.; Marzouk, B. e Cherif, A. (1984). Evolución de los lípidos en el curso de la sobremaduración de las aceitunas. *Olivae*, 3(14): 14 – 17.

Salvador, M. D.; Aranda, F. e 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.

Salvador, M. D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S. e 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.

Sanchez, J. E Harwood, J. L. (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 564 – 573.

Sandalidou, E. e Baourakis, G. (2002). Customers` perspectives on the quality of organic olive oil in Greece. *British Food Journal*, 104(3/4/5): 391 – 406.

Sanz-Cortes, F.; Parfitt, D. E.; Romero, C.; Struss, D.; Llacer, G. e Badenes, M. L. (2003). Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Plant Breeding*, 122: 173 – 177.

Santos, M. (2009). *A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento*. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Sayago, A.; Marin, M. I.; Aparicio, R. e Morales, M. T. (2007). Vitamin E and vegetable oils. *Grasas e Aceites*, 58: 74 – 86.

Serviço de Reconhecimento e de Ordenamento Agrário – SROA (1966). Carta de Solos de Portugal. Papelaria Fernandes, Lisboa.

Servilli, M. e Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 602 – 613.

Sharma, S. (1996). *Applied Multivariate Techniques*. John Wiley & Sons; New York.

- Sigma- Aldrich (2015). Acedido a 28 de Dezembro de 2015 em www.sigmaaldrich.com.
- Simões-Lopes, P.; Gouveia, J.; Peres, M.; Gouveia, C.; Henriques, L.; Pinheiro-Alves, M. e Freitas, A. (2006). Qualidade dos azeites virgens portugueses com Denominação de Origem Protegida (DOP). *Melhoramento*. 41: 210 – 216.
- Sivakumar, G.; Bati, C.; Perri, E.; Uccella, N. (2006). Gas chromatography screening of bioactive phytosterols from mono-cultivar olive oils. *Food Chemistry*, 95: 525 – 528.
- Soto-Vaca, A; Gutierrez, A.; Losso, J. N.; Xu, Z. e Finley, J. W. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 6658 – 6677.
- StatSoft (2001). *STATISTICA (Data analysis software system), Version 6*, Statsoft, Inc, Melbourne – Australia.
- Taamalli, A.; roman, D. A.; Zarrouk, M.; Segura-Carretero, A. e Fernandez-Gutierrez, A. (2012). Classification of chemlali acessions according to the geographical area using chemometric methods of phenolic profiles analysing by HPLC-ESI-TOF-MS. *Food Chemistry*, 132: 561 – 566.
- Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Majo, D.; Giammanco, S.; Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18: 98 – 112.
- Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospective. *Italian Journal of Food Science*, 2(10): 99 – 115.
- Tsimidou, M.; Macrae, R. e Wilson, I. (1987). Authentication of virgin olive oils using principal component analysis of triglyceride and fatty acid profiles: part 1. Classification of Greek olive oils. *Food Chemistry*, 25: 251 – 258.
- Tura, D.; Gigliotti, C.; Pedò, S.; Failla, O.; Bassi, D. e Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, 112: 108 – 119.

Uceda, M. e Hermoso, M. (1998). La calidad del aceite de oliva. In: *El cultivo del olivo*. D. Barroso, R. Fernandez-Escobar e L. Rallo (Ed). Coedición Junta de Andalucía e Ediciones Mundi-Prensa. pp. 548 – 572.

Uceda, M.; Aguilera, M. (2010). Olive Oil Quality. In: *Olive Growing*, 5th Ed. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., Eds.; RIRDC: Pendle Hill, Australia. pp 619 – 646.

Universitat de les Illes Balears (2013). Estrutura química do ácido oleico. Acedido a 9 de Junho de 2013 em www.uib.es.

Vaz-Freire, L.; Gouveia, J. e Freitas, A. (2008). Analytical characteristics of olive oils produced by two different extraction techniques, in the portuguese olive variety “Galega vulgar”. *Grasas y Aceites*. **59(3)**: 260 – 266.

Veá (2011). Aceite de Oliva. El olivo – La Arbequina. Acedido em 26 de Outubro de 2011 em www.vea.es/688_spanish/la_Arbequina_web.htm.

Velasco, J. e Dobraganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**: 661 – 671.

Viola, P.; Viola, M. (2009). Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clinics in Dermatology*, **27(2)**: 159-165.

Wagner, K. e Elmadfa, I. (2000). Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**: 624 – 676.

Wiesman, Z.; Ronen, A.; Ankarion, Y.; Novikov, V.; Maranz, S.; Chpagain, B., Abramovich, Z. (2002). Effect of olive-nutri-vant on yield and quality of olives and oil. *Acta Horticola*, **594**: 557 – 562.

Yorulmaz, A.; Erinc, H. e Tekin, A. (2013). Changes in olive oil characteristics during maturation. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **90**: 647 - 658

Zarrouk W.; Baccouri, B.; Taamali, Trigui, A.; Daoud, D. e Zarrouk, M. (2009). Oil fatty acid composition of eighteen Mediterranean olive varieties cultivated under the arid conditions of Boughrara (southern Tunisia). *Grasas e Aceites*, **60(5)**: 498 – 506.

Zeiner, M.; Stefan, I.; Cindric, I. (2005). Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: a pilot study on the geographical characterization. *Microchemical Journal*, 81: 171 – 176.

Ziarati, P.; Tosifi, S. (2014). Comparing some physical and chemical properties of green olive (*Olea europea*, L.) in Iran association with ecological conditions. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(2): 519 – 528.

Zoidou, E.; Melliou, E.; Gikas, E.; Tzarbopoulos, A.; Magiatis, P. e Skaltsounis, A. (2010). Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1): 46 – 50.