



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE
PÚBLICA**

**MONITORIZAÇÃO, AO LONGO DE 12 MESES DOS TEORES DE
PERÓXIDOS, ALDEÍDOS E CLOROFILA DE AZEITES VIRGEM
EXTRA, MONOVARIETAIS E DE MISTURA, PRODUZIDOS EM
PORTUGAL E ARMAZENADOS EM 4 DIFERENTES CONDIÇÕES**

Trabalho submetido por
Liliana de Jesus Ligas Serrano
para obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública

Junho de 2014



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE
PÚBLICA**

**MONITORIZAÇÃO, AO LONGO DE 12 MESES DOS TEORES DE
PERÓXIDOS, ALDEÍDOS E CLOROFILA DE AZEITES VIRGEM
EXTRA, MONOVARIETAIS E DE MISTURA, PRODUZIDOS EM
PORTUGAL E ARMAZENADOS EM 4 DIFERENTES CONDIÇÕES**

Trabalho submetido por
Liliana de Jesus Ligas Serrano
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública

Trabalho orientado por
Doutora Zilda Braga Morais

Junho de 2014

DEDICATÓRIA

Pela motivação e força que sempre me transmitiste

Para ti, Avó Teresa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e avós por todo o apoio e incentivo, que demonstraram desde o primeiro instante em que iniciei este trabalho.

Ao Álvaro Martins, pela força e apoio incondicional no decorrer deste trabalho.

À Prof Zilda Morais, minha orientadora, pelo apoio, estímulo transmitidos nas várias etapas do projecto.

Ao Centro de Investigação da Cooperativa Egas Moniz, CiiEM, que financiou este trabalho.

Às minhas colegas de investigação, Ana Sofia Cruz e Sofia Sousa, pela sua disponibilidade.

Aos meus colegas de trabalho e à responsável dos Laboratórios de Saúde Pública do Alentejo Dra Margarida Passanha, pela compreensão.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a variação de 6 parâmetros químicos do azeite virgem extra, ao longo de 12 meses, sob quatro condições de armazenamento. Para isso, seleccionaram-se 10 amostras de azeite de virgem extra, representativas das principais regiões produtoras de Portugal, sendo 5 monovarietais, das variedades Arbequina, Cobrançosa, Galega, Picual e 5 de mistura.

Os azeites foram recolhidos directamente nos locais de produção, entre Novembro de 2012 e Janeiro de 2013. No laboratório da Egas Moniz, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas em quatro condições: (1) à temperatura controlada a 4°C, em frasco âmbar e no escuro (4°C); (2) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco âmbar e sob luz artificial (FELA); (3) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco incolor e sob luz artificial (FILA); (4) à temperatura ambiente não controlada, em frasco incolor e sob luz natural (FILN).

Os parâmetros índice de peróxidos, índice de anisidina e teor de clorofila foram analisados bimestralmente enquanto os parâmetros tocoferóis totais, índice de iodo e índice de acidez foram analisados com intervalos maiores e variados.

Para o índice de peróxidos os tempos médios, em meses, estimados para atingir o valor máximo de 20 meq O₂/kg, nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN, foram de 16, 12, 8 e 9, respectivamente.

Para o índice de anisidina, não se observaram alterações significativas no valor característico de cada amostra, nas 4 condições estudadas.

No teor de clorofila, as condições a 4°C no escuro e FELA, não alteraram as quantidades iniciais de modo significativo. A condição FILA favoreceu o decréscimo dos teores de clorofila, havendo azeites mais sensíveis que outros. Na condição FILN, as amostras apresentaram valores correspondentes a 58% do teor inicial, já no 2º mês de armazenamento.

Em relação ao índice de iodo e aos tocoferóis totais, verificou-se uma tendência de decréscimo, sobretudo na condição FILN.

Todas as amostras mantiveram o índice de acidez inferior a 0,8 durante os 12 meses deste estudo.

ABSTRACT

In this work, the variation of 6 chemical parameters of extra virgin olive oil were studied in 4 conditions of storage, over 12 months. For this, 10 representative extra virgin olive oil samples of the major producing regions of Portugal were selected, being 5 monovarietal samples, from the varieties Arbequina, Cobrançosa, Galega and Picual, and 5 of mixed varieties. The oils were collected directly at the production sites, between November 2012 and January 2013. In the Egas Moniz laboratory, the samples were placed in glass vials and stored in four conditions: (1) temperature controlled at 4 °C in flask amber in the dark (4 °C); (2) at controlled room temperature 22-26 °C in amber bottle and under artificial light (FELA); (3) at controlled room temperature 22-26 °C, in clear bottle and under artificial light (FILA); (4) at not controlled room temperature, colorless bottle and under natural light (FILN). The parameters peroxide value, anisidine index and chlorophyll content were analyzed bimonthly while tocopherols parameters, iodine and acid number were analyzed in larger and varied ranges.

For the peroxide value, the meantime, in months, estimated to reach the maximum value of 20 meq O₂/kg, in the conditions 4 °C, FELA, FILA and FILN, were 16, 12, 8 and 9, respectively.

For anisidine index, no significant changes in the characteristic value of each sample were observed in the 4 conditions studied.

In chlorophyll content, the conditions at 4 °C in the dark and FELA did not change the initial amounts significantly. The FILA condition favored the decrease in chlorophyll content; some oils were more sensitive than others. In relation to FILN condition, the samples showed chlorophyll values corresponding to 58% of the initial content, at the 2nd month of storage.

Regarding iodine index and total tocopherols, there was a decreasing trend, especially in the FILN condition.

All samples retained the acid index below 0.8 during the 12 months of study.

Índice

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTO	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
CORPO DO TRABALHO	11
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	10

CORPO DO TRABALHO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVO.....	11
1.2. A OLIVEIRA, AS VARIEDADES DE AZEITONA	11
1.2.1. VARIEDADE ARBEQUINA	13
1.2.2. VARIEDADE COBRANÇOSA.....	14
1.2.3. VARIEDADE CORDOVID	14
1.2.4. VARIEDADE GALEGA.....	14
1.2.5. VARIEDADE MAÇANILHA	15
1.2.6. VARIEDADE PICUAL	15
1.2.7. VARIEDADE VERDEAL	15
1.3. A ATUAL IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E ECONÓMICA DO AZEITE	15
1.4 DESIGNAÇÕES DE PRODUTOS LÍQUIDOS DA AZEITONA.....	20
1.5. PROCESSO DE FABRICO DO AZEITE VIRGEM	22
1.6. COMPOSIÇÃO DO AZEITE	27
1.6.1 CONSTITUINTES MAIORITÁRIOS, A FRACÇÃO SAPONIFICÁVEL.....	28
1.6.2 CONSTITUINTES MINORITÁRIOS, A FRACÇÃO INSAPONIFICÁVEL	30
1.7 PARÂMETROS DE CONFORMIDADE PARA AS CATEGORIAS DOS PRODUTOS LÍQUIDOS DA AZEITONA	35
1.8 PRINCIPAIS FACTORES NA CONSERVAÇÃO DO AZEITE.....	42
1.9 ESTRATÉGIA ADOPTADA NO TRABALHO.....	49
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	54
2.1 SELECÇÃO, RECOLHA, EMBALAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	54
2.2. MÉTODOS UTILIZADOS E PERIODICIDADE DOS ENSAIOS.....	57
2.3. PARÂMETROS PRINCIPAIS	58
2.3.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS, IP.....	58
2.3.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ANISIDINA, IPA.....	59
2.3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA, C	61

2.4. PARÂMETROS AUXILIARES	61
2.4.1. DETERMINAÇÃO ÍNDICE DE IODO, IID	61
2.4.2. DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS TOTAIS, TT	62
2.4.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ, IA	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1. RESULTADOS POR AMOSTRA	64
3.1.1. AMOSTRA 1M	64
3.1.2. AMOSTRA 2C	65
3.1.3. AMOSTRA 3P	66
3.1.4. AMOSTRA 4M	67
3.1.5. AMOSTRA 5A	68
3.1.6. AMOSTRA 5P	69
3.1.7. AMOSTRA 6D	70
3.1.8. AMOSTRA 6G	71
3.1.9. AMOSTRA 6M	72
3.1.10. AMOSTRA 7M	73
3.2. RESULTADOS DOS PARÂMETROS NO CONJUNTO DAS AMOSTRAS NAS 4 CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	74
3.2.1. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS	74
3.2.2. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE ANISIDINA E DO PARÂMETRO TOTOX.....	80
3.2.3. EVOLUÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA	83
3.2.4. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE IODO.....	89
3.2.5. EVOLUÇÃO DOS TOCOFERÓIS TOTAIS	90
3.2.6. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ	92
3.3. RESUMO DOS RESULTADOS	93
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
5. BIBLIOGRAFIA	95

Anexos

Anexo A - MINUTA DO PROTOCOLO DE COLABORAÇÃO COM OS FORNECEDORES DAS AMOSTRAS

Anexo B - RELATÓRIOS DE ENSAIO INSA- ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Anexo C - RESULTADOS GERAIS

Anexo D - ANÁLISE SENSORIAL DO AZEITE - REGULAMENTO CE-640/2008

Índice de Figuras

FIGURA 1	Tamanho médio do fruto das variedades Galega, Cobrançosa, Arbequina, Picual, Cornezuelo, Verdeal, Azeitona, Maçanilha e Redondil (Sousa, 2009)	13
FIGURA 2	Distribuição dos artigos sobre “Olive oil” no período 1900-2014 (adaptado de Google scholar, 2014)	16
FIGURA 3	Produção (hL) de azeite em Portugal em 1995 e em 2011 (BES, 2013)	19
FIGURA 4	Exportação de azeite português em 2012, por país de destino (BES, 2013)	20
FIGURA 5	Etapas do processo de obtenção de azeite virgem (DREAlentejo, 2013)	22
FIGURA 6	Apanha mecanizada da azeitona (foto Z. Morais, 2013)	23
FIGURA 7	Lavagem (à esquerda) e trituração (à direita) da azeitona (foto L. Serrano, 2013)	24
FIGURA 8	Batedeira, vista superior (à esquerda) e vista lateral (à direita) (foto L. Serrano, 2013)	25
FIGURA 9	Centrifugas horizontais, vista geral (à esquerda) e centrífuga vertical (à direita) (foto L. Serrano, 2013)	26
FIGURA 10	Produto final, azeite virgem (foto L. Serrano, 2013)	26
FIGURA 11	Estrutura da trioleína, OOO	28
FIGURA 12	Da esquerda para a direita: estruturas da oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol, compostos fenólicos hidrofílicos	30
FIGURA 13	Composição química da fracção insaponificável do azeite (adaptado de APA-PE, 2012)	31
FIGURA 14	Estruturas de hidrocarbonetos abundantes no azeite. Esqualeno, um tripterpeno, C ₃₀ H ₅₀ , precursor dos esteróides. Beta-caroteno e luteína, tetraterpenos, carotenoides	32
FIGURA 15	Estruturas dos isómeros eritrodíol, à esquerda, e uvaol, à direita	32
FIGURA 16	À esquerda, estrutura de um ácido tânico, um polifenol lipofílico. À direita, estrutura do oleocantal, um composto fenólico lipofílico	33
FIGURA 17	Estrutura do alfa-tocoferol, o mais abundante tocoferol do azeite, um composto fenólico lipofílico	33
FIGURA 18	Estrutura do sitosterol, um esteroide	33
FIGURA 19	Estrutura do oleato de oleilo, um éster C ₃₆	34
FIGURA 20	Estrutura da clorofila a	34
FIGURA 21	Características dos Azeites. Reg (UE) 61/2011 – Anexo I - 1ª parte	40
FIGURA 22	Características dos Azeites. Reg (UE) 61/2011 – Anexo I - 2ª parte	41
FIGURA 23	Mecanismo de adição da foto-oxidação (oxidação singlete) do ácido oleico, com formação de <i>trans</i> -hidroperóxidos (Frankel, 1985)	44
FIGURA 24	Mecanismo de auto-oxidação (oxidação tripleto) do ácido oleico, com formação de hidroperóxidos <i>cis</i> e <i>trans</i> (Frankel, 1985)	45
FIGURA 25	Oxidação secundária (adaptado de Jacobsen, 2013 e Frankel, 1998)	46
FIGURA 26	Efeito do ar, luz e temperatura de fritura, 180°C, no índice de peróxidos, PV, e no índice de anisidina, <i>p</i> -AV, em amostras de azeite, óleo de milho e óleo de soja (adaptado de Naz <i>et al</i> , 2005)	47
FIGURA 27	Reacções envolvidas na determinação do índice de peróxidos	51
FIGURA 28	Reacção envolvida na determinação do índice de anisidina	51
FIGURA 29	Conversão das clorofilas a e b nas feofitinas respectivas (Adaptado de Hsu, Chao, Hu & Yang, 2013)	51
FIGURA 30	Reacção envolvida na determinação do índice de iodo	52
FIGURA 31	Reacção de Emmerie-Engel, determinação dos tocoferóis totais, em que α tocoferol: R ₁ =H, R ₂ =CH ₃ ; R ₃ =CH ₃ ; β tocoferol: R ₁ =CH ₃ , R ₂ =CH ₃ ; R ₃ =H; γ tocoferol: R ₁ =H, R ₂ =CH ₃ , R ₃ =CH ₃	52
FIGURA 32	Reacção envolvida na determinação do índice de acidez	53
FIGURA 33	Localização geográfica dos locais de colheita das amostras de azeite	54
FIGURA 34	Condições de armazenamento das amostras: (A) a 4°C, (B) FELA, (C) FILA, (D) FILN, instalações da Coop Egas Moniz (foto Z Morais, 2013)	57
FIGURA 35	Evolução do índice de peróxidos na amostra 1M, ao longo de 12 meses nas quatro condições de armazenamento	65
FIGURA 36	Evolução do índice de peróxidos na amostra 2C nas quatro condições de	

	armazenamento	66
FIGURA 37	Evolução do índice de peróxidos na amostra 3P nas quatro condições de armazenamento	67
FIGURA 38	Evolução do índice de peróxidos na amostra 4M nas quatro condições de armazenamento	68
FIGURA 39	Evolução do índice de peróxidos na amostra 5A nas quatro condições de armazenamento	69
FIGURA 40	Evolução do índice de peróxidos na amostra 5P nas quatro condições de armazenamento	70
FIGURA 41	Evolução do índice de peróxidos na amostra 6D nas quatro condições de armazenamento	71
FIGURA 42	Evolução do índice de peróxidos na amostra 6G nas quatro condições de armazenamento	72
FIGURA 43	Evolução do índice de peróxidos na amostra 6M nas quatro condições de armazenamento	73
FIGURA 44	Evolução do índice de peróxidos na amostra 7M nas quatro condições de armazenamento	73
FIGURA 45	Evolução do índice de peróxidos, por azeite monovarietal e por condição de armazenamento, ao longo de 12 meses	76
FIGURA 46	Evolução do índice de peróxidos, por azeite de mistura e por condição de armazenamento, ao longo de 12 meses	77
FIGURA 47	Correlação do índice de peróxidos de cada amostra com o tempo de armazenamento, nas condições: 4°C; FELA; FILA; FILN. A preto, em cada gráfico: recta média	78
FIGURA 48	Evolução do índice de anisidina em azeites virgem extra das variedades Cobrançosa, Galega, Picual e Arbequina ao longo de 12 meses de armazenamento nas condições a 4°C, FELA, FILA e FILN	81
FIGURA 49	Evolução do índice de anisidina em azeites virgem de mistura, amostras 1M, 4M, 6D, 6M e 7M, ao longo de 12 meses de armazenamento nas condições a 4°C, FELA, FILA e FILN	82
FIGURA 50	Evolução do teor em clorofila (mg/kg) das amostras monovariais 2C, 3P, 5A, 5P e 6G, ao longo de 12 meses, nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN	84
FIGURA 51	Evolução do teor em clorofila (mg/kg) dos azeites de mistura 1M, 4M, 6D, 6M e 7M ao longo de 12 meses, nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN	85
FIGURA 52	Evolução da clorofila após 4 meses da produção do azeite, nas 4 condições de armazenamento (foto Z Morais, 2013)	87
FIGURA 53	Índice de acidez (g/100g ácido oleico) das amostras em estudo após 12 meses de armazenamento, nas condições a 4°C e FILN	92

Índice de Tabelas

TABELA 1	Composição geral da azeitona (adaptado INSA, 2006)	12
TABELA 2	Composição em ácidos gordos do azeite virgem, azeite refinado e óleo de bagaço de azeitona refinado (Codex Alimentarius, 2003)	28
TABELA 3	Áreas cromatográficas médias dos compostos fenólicos presentes em amostras de azeites monovarietais e de azeites comerciais de mistura de variedades (Gouvinhas <i>et al</i> , 2014)	30
TABELA 4	Estudos recentes sobre a estabilidade do azeite, em várias condições de armazenagem	48
TABELA 5	Lista dos fornecedores, variedades da azeitona de cada amostra, identificação da amostra e datas da colheita	55
TABELA 6	Referências dos procedimentos analíticos e sua periodicidade	57
TABELA 7	Data de realização das determinações de Índice de Peróxidos, Índice de Anisidina e Clorofila, e tempo decorrido após a colheita	58
TABELA 8	Indicação da toma de ensaio para a determinação do índice de peróxidos	58
TABELA 9	Indicação da toma de ensaio para a determinação do índice de acidez	63
TABELA 10	Valores médios de índice de peróxidos das amostras nas condições de armazenamento 4°C, FELA, FILA e FILN	74
TABELA 11	Parâmetros da equação da recta média $IP = f(t)$, nas 4 condições de armazenamento, e estimativa do tempo, em meses, para atingir o valor de $IP = 20 \text{ meqO}_2/\text{kg}$	79
TABELA 12	Comparação de resultados de índice de peróxidos CiiEM & INSA	12
TABELA 13	Valores de probabilidade, p , intra-amostra para coincidência de médias dos teores de clorofila ao longo de 12 meses de armazenamento a 4°C no escuro	86
TABELA 14	Valores de probabilidade, p , para coincidência de médias dos teores de clorofila intra-amostra com o valor médio 7,92 inter-amostra	86
TABELA 15	Valores de probabilidade, p , de coincidência de médias intra-amostra das condições FELA, FILA e FILN ($n = 3$) comparativamente à média da condição 4°C no escuro ($n = 18$)	88
TABELA 16	Índice de iodo das amostras 5A e 6G, após 6 meses de armazenamento, e das amostras 2C e 3P e 5P, após 10 meses de armazenamento, nas condições FELA, FILA e FILN	90
TABELA 17	Comparação dos tocoferóis das variedades Cobrançosa, Arbequina, Picual e Galega, após 10 meses de armazenamento nas condições 4°C, FELA e FILN	91
TABELA 18	Resumo dos resultados	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVO

O azeite virgem-extra é um produto típico da região Mediterrânica que vem apresentando crescente importância gastronómica, nutricional e económica a nível mundial, pelo que, a garantia da sua qualidade no momento da sua utilização pelo consumidor é um tema fundamental para os países produtores como Portugal, o qual é, actualmente, o quarto maior produtor europeu de azeite.

Neste trabalho, inserido no Mestrado em ‘Segurança Alimentar e Saúde Pública e financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, CiiEM, monitorizou-se, ao longo de 12 meses, o estado de conservação de azeites virgem-extra, monovarietais e de mistura, produzidos em Portugal e armazenados em 4 condições possíveis de serem utilizadas pelo consumidor de azeite. O objectivo geral foi comparar o efeito do tipo de armazenagem na qualidade do produto. As amostras foram escolhidas com vista a serem representativas da variedade de azeites que são produzidos nas diferentes regiões de Portugal.

No presente texto incluiu-se uma breve descrição sobre as características gerais das variedades de azeitona utilizadas e o processo de fabrico do azeite, de modo a relacionar o produto final com a matéria-prima.

1.2. A OLIVEIRA, AS VARIEDADES DE AZEITONA

A oliveira, cujo nome sistemático é *Olea europaea*, representa a única espécie da família das Oleaceae com fruto comestível, sendo considerada a árvore mais antiga cultivada pelo homem (Vossen, 2007). Nativa da parte oriental do mar Mediterrâneo, Irão e sul do Cáucaso, a oliveira requer um clima caracterizado por invernos amenos, primaveras ou outonos chuvosos, verões quentes e secos e, além disso, grande luminosidade. A oliveira é uma árvore de porte médio, muito resistente, com raízes que atingem os 6 metros e com grande longevidade: em Portugal existem oliveiras com mais de 2000 anos (Firmino, 2010).

A oliveira apresenta um crescimento lento, o início da produção de frutos depende da variedade, por exemplo, a Arbequina e a Koroneiki, em geral, produzem a partir do terceiro ano enquanto a Galega, em condições favoráveis, a partir do quinto.

Embora todas as variedades de azeitona possam, em princípio, ser utilizadas como azeitona de mesa e na produção de azeite, o facto é que, ao longo dos anos, foram sendo seleccionadas as variedades com características mais adequadas para a mesa, como por exemplo o maior tamanho do fruto e a facilidade de desprendimento da polpa do caroço, e as variedades mais adequadas para azeite, por exemplo o maior rendimento em azeite por quilo de azeitona.

A tabela 1 apresenta a composição geral da azeitona. Como pode ver-se, está presente uma gordura média de 18,5 g/100g da qual cerca de 9,6 g corresponde a ácidos gordos monoinsaturados – sobretudo ácido oléico.

TABELA 1. Composição geral da azeitona (adaptado de INSA, 2006)

Macroconstituintes		Vitaminas	
Componentes	Por 100g*	Componentes	por 100g*
Água, g	71,9	Vitamina A total (equivalentes de retinol), µg	39
Proteína, g	1,4	Caroteno, mg	235
Gordura Total, g	18,5	Vitamina D, µg	0
Total de hidratos de carbono disponíveis, g	0	α-tocoferol, mg	2,0
Total de hidratos de carbono expresso em monossacáridos, g	0	Tiamina, mg	0,020
Mono+dissacáridos	0	Riboflavina, Mg	0,070
Ácidos Orgânicos, g	0	Equivalentes de niacina, mg	0,70
Álcool, g	0	Niacina, mg	0,50
Amido, g	0	Triptofano/60, mg	0,20
Oligossacáridos, g	0	Vitamina B6, mg	0,020
Fibra alimentar, g	4,0	Vitamina B12, µg	0
		Vitamina C, mg	0
		Fosfatos, µg	0

Ácidos Gordos		Minerais	
Componentes	por 100g*	Componentes	por 100g*
Ácidos gordos saturados, g	2,9	Cinza, g	5,10
Ácidos gordos monoinsaturados, g	9,6	Sódio(Na), mg	2100
Ácidos gordos polinsaturados, g	2,2	Potássio(K), mg	60
Ácidos gordos trans, g	0	Cálcio (K), mg	54
Ácidos linoleico, g	2,0	Fósforo (P), mg	14
		Magnésio(Mg), mg	22
		Ferro(Fe), mg	1,6
		Zinco (Zn), mg	0,2

*de parte edível

Actualmente, os 10 maiores produtores de azeitona localizam-se no Mediterrâneo e são responsáveis por mais de 90% da produção total. Em Portugal, a campanha 2013-14 produziu cerca de 11,5 mil toneladas de azeitona de mesa e 90 mil toneladas de azeite, sendo o rendimento médio de 14,7 kg de azeite por 100 kg de azeitona (SIAZ, 2014).

São presentemente conhecidas cerca de 332 variedades de azeitona (Trujillo, Ojeda, Urdirroz, Potter, Barranco, Rallo, & Diez, 2014), embora as variedades mais difundidas sejam em muito menor número. Neste trabalho utilizaram-se azeites monovarietais das variedades Arbequina, Cobrançosa, Galega e Picual e azeites de mistura que continham também as variedades Cordovil, Maçanilha Algarvia e Verdeal.

A figura 1, extraída de um documento do Ministério da Agricultura (Sousa, 2009), apresenta, em cm, os tamanhos longitudinais e transversais médios dos frutos das variedades utilizadas neste trabalho, excepto a Cordovil.

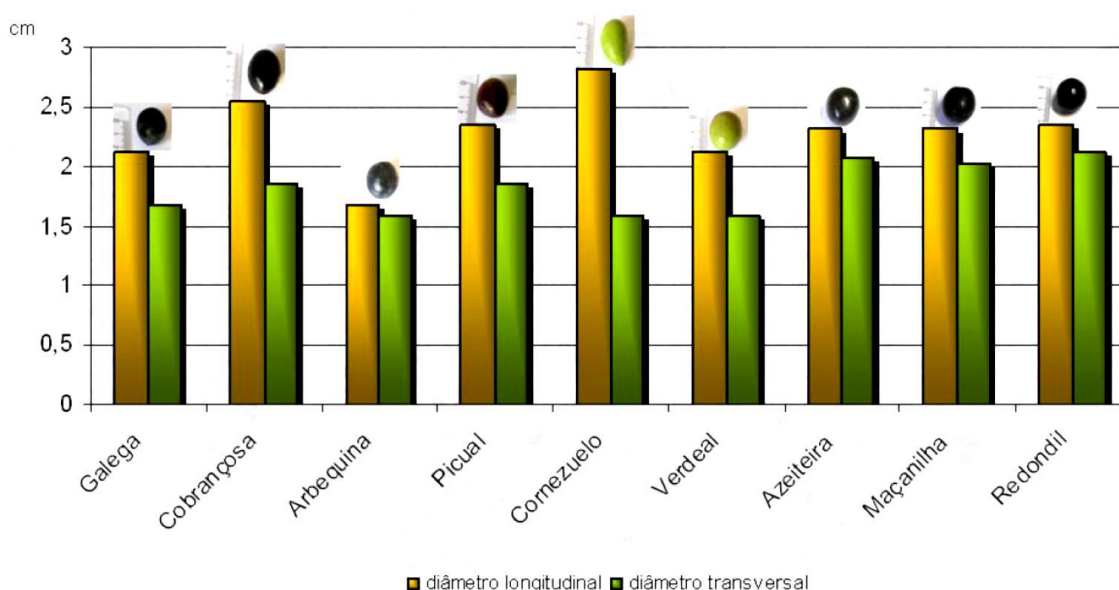


FIGURA 1. Tamanho médio do fruto das variedades Galega, Cobrançosa, Arbequina, Picual, Cornezuelo, Verdeal, Azeitreira, Maçanilha e Redondil (Sousa, 2009).

Os tópicos a seguir, adaptados de textos relacionados com a produção de azeite (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013; Filipe, 2014), incidem maioritariamente sobre a origem da variedade, os requisitos da oliveira, o aspecto físico da azeitona e as propriedades organolépticas do azeite.

1.2.1. VARIEDADE ARBEQUINA

Esta variedade, de origem espanhola, tem a sua principal área de cultivo na Catalunha, embora também já se encontre um pouco por todo o mundo, em especial na Argentina. A árvore da Arbequina tem dimensão reduzida, adapta-se a terrenos pobres e apresenta alta resistência ao frio. A azeitona Arbequina, de forma ovalada quase redonda (Fig. 1), tem uma baixa relação polpa/caroço e pequeno tamanho, o que leva a dificuldades na

colheita mecanizada. É uma variedade muito apreciada pela sua precocidade, elevada produtividade e bom rendimento de gordura (cerca de 20,5%). Quando começa a colheita, as azeitonas são muito verdes e isso reflecte-se sobre as características organolépticas do azeite. Normalmente, estas azeitonas nunca chegam à maturação total. Os azeites obtidos têm atributos bem definidos, com sabores mais verdes, amargos e picantes, no início da colheita, e mais doces no final, sendo utilizados especialmente para o tempêro de saladas, verduras.

1.2.2. VARIEDADE COBRANÇOSA

Esta variedade é cultivada principalmente no nordeste de Portugal, em Trás-os-Montes, mas, nos últimos anos, o seu plantio tem vindo a ser alargado a todo o país. A oliveira Cobrançosa adapta-se bem a climas severos, seja ao frio ou ao calor, e apresenta boas condições para a colheita mecânica. O fruto é rico em polifenóis, por isso resistente à oxidação, e a sua polpa tem uma textura consistente, pelo que, além da produção de azeite, costuma ser processado para conserva, azeitona de mesa. O rendimento em azeite varia entre os 18 a 22%, o qual, quando processado num estado inicial de maturação do fruto, tem um sabor ligeiramente amargo e picante, que passa a doce e suave, à medida que avança o estado de maturação.

1.2.3. VARIEDADE CORDOVID

Cultivares característicos desenvolvidos na Beira Interior (Castelo Branco) e no Alentejo (Serpa). Fruto apropriado para colheita por vibração. O seu azeite é especialmente rico em ácido oleico, muito utilizado também em conserva.

1.2.4. VARIEDADE GALEGA

É uma variedade exclusivamente portuguesa, pelo que, fora do país, é muitas vezes referida como a azeitona portuguesa. É a variedade mais difundida em Portugal, muito frequente nas Beiras, Alentejo e Algarve.

Consegue-se distinguir das restantes variedades pelo seu pequeno calibre, de cor verde médio com alguma pruína, e preto intenso quando madura. O caroço elíptico com uma superfície lisa tem estrias pouco vincadas e sabor característico. Oferece resistência ao desprendimento da oliveira, pelo que dificulta a apanha mecânica. É utilizada em azeite, embora o rendimento não seja elevado, e em conserva. Os azeites são, de um modo

geral, espessos na boca, muito doces, com frutado ligeiro e notas suaves de verde folha e marcadas de maçã madura e também de frutos secos.

1.2.5. VARIEDADE MAÇANILHA

A variedade Maçanilha Algarvia é conhecida pela sua tolerância ao frio, à seca e à salinidade. A capacidade de enraizamento, a entrada em produção, a época de maturação e a produtividade situam-se, em geral, na média das escalas respectivas.

Os seus frutos são pouco resistentes ao desprendimento, o que contribui para a colheita mecanizada. Pode ser utilizada tanto para obtenção de azeite, como para azeitona de mesa, verdes ou maduras, devido ao tamanho e calibre dos seus frutos. A separação da polpa do caroço é difícil.

1.2.6. VARIEDADE PICUAL

A mais abundante variedade de azeitona no mundo, devido à sua forte implantação em Espanha, de onde é originária, sendo 85% da região de Jaén. O seu nome inspira-se no fruto, que possui uma forma em pico. Esta variedade apresenta particular tolerância ao frio, salinidade e excesso de humidade no solo. A entrada em produção é precoce. Apresenta uma alta produtividade para azeite (cerca de 22%), o qual é de qualidade mediana e ligeiramente amargo, devido aos polifenóis presentes.

1.2.7. VARIEDADE VERDEAL

A azeitona Verdeal adapta-se bem praticamente a todo o solo português. É frequente tanto no Alentejo (Verdeal Alentejana) como em Trás-os-Montes (Verdeal Transmontana). Amadurece tardiamente. É utilizada para conserva, em verde ou triturada, mas principalmente para a extracção de azeite, com um bom rendimento. O azeite resultante é bastante fino, com um frutado marcante, persistente, com verde de folha e sabor bastante amargo e picante.

1.3. A ATUAL IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E ECONÓMICA DO AZEITE

O azeite, que deriva do vocábulo árabe ‘Az-zait’ (sumo de azeitona) é um lípido líquido à temperatura ambiente de 20°C. A sua origem remonta à Ásia Ocidental mas depressa se estendeu à zona mediterrânica onde, desde cedo, converteu-se no principal óleo alimentar da maioria dos povos mediterrânicos (Vossen, 2007).

Embora o consumo de azeite já fosse tradicionalmente considerado saudável pelas populações do mediterrâneo, o seu benefício para a saúde somente alcançou um impacto a nível mundial a partir da difusão por vários autores, na década de 90, por exemplo Nestlé (1995), dos trabalhos de investigação de Ancel Keys, em especial a comparação que fez sobre a incidência de doença coronária e morte em 7 países e a sua associação com o modo de vida e a alimentação dos seus habitantes (Keys, 1980). Este autor propôs que a maior longevidade e menor ocorrência de doenças cardiovasculares em países como a Grécia estaria relacionada com o que ele classificou como «dieta mediterrânica», da qual o consumo de azeite é parte indissociável. Desde então ocorreu um grande aumento na investigação científica sobre o azeite, como se verifica na figura 2. Considerando o período de 1900 a maio de 2014, estão contabilizados no Google Scholar 5659 artigos científicos em que o termo “Olive Oil” consta no título. Destes, 5312 artigos, ou seja 94%, foram publicados no período de 1990 a 2014.

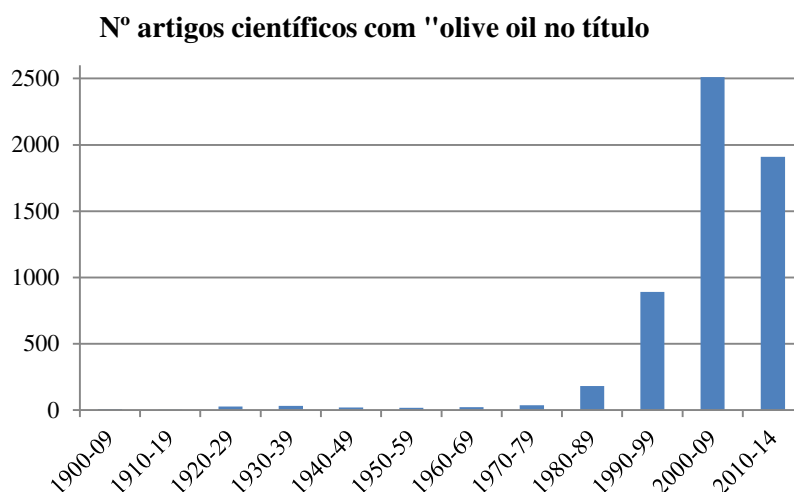


FIGURA 2. Distribuição dos artigos sobre “Olive oil” no período 1900-2014 (adaptado de Google scholar, 2014).

Muitos destes estudos procuram comprovar cientificamente as alegações de saúde tradicionalmente associadas ao azeite. Por exemplo, as populações do Mediterrâneo atribuem-lhe culturalmente um efeito benéfico no equilíbrio da pressão arterial. Em 2008, investigadores mexicanos realizaram ensaios clínicos com humanos e propuseram o ácido oleico como o principal responsável por este efeito (Terés, Barcelo-Coblijn, Benet, Alvarez, Bressani, Halver & Escribá, 2008).

Para além das doenças cardiovasculares, o consumo de azeite virgem-extra também tem vindo a ser associado a efeitos anti-inflamatórios (des Gachons, Uchida, Bryant, Shima, Sperry, Dankulich-Nagrudny,... & Breslin, 2011) e a uma menor incidência de

distúrbios neurológicos e cancro da mama (Erol-Dayi, Arda & Erdem, 2012), entre outros. Estas propriedades saudáveis do azeite têm sido relacionadas com componentes minoritários, sobretudo com os compostos fenólicos (Garcia, Magalhães, Fregapane, Salvador & Paiva-Martins, 2012). Contudo, a composição fenólica qualitativa e quantitativa do azeite de virgem extra é amplamente afectada por muitas variáveis relacionadas a todas as etapas da produção, que vão desde a fase de maturação dos frutos de oliveira até as condições de armazenamento (Koseoglu & Unal, 2004), além de vários factores de genótipo (El Riachy, Priego-Capote, Rallo, Luque-de Castro & León, 2012).

Uma vez concluídos os estudos sobre uma alegação de saúde, realizados por vários grupos de investigação, cabe à autoridade competente reconhecer ou não estas alegações, segundo os regulamentos vigentes.

Em relação a 7 alegações de saúde relacionadas com os compostos fenólicos e polifenóis do azeite, a European Food Safety Agency, EFSA, divulgou em 2011 o parecer de um painel científico sobre a sua fundamentação, nos termos do artigo 13 (1) do Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (Agostoni, Bresson, Tait, Flynn, Golly, Korhonen,... & Verhagen, 2011), que se transcreve resumidamente a seguir:

- Protecção das partículas de LDL de danos oxidativos (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) → *Com base nos dados apresentados, o Painel concluiu que foi estabelecida uma relação de causa e efeito entre o consumo de polifenóis do azeite (normalizado pelo teor de hidroxitirosol e seus derivados) e à protecção das partículas de LDL de danos oxidativos. O Painel considerou que a alegação é suportada pelo consumo diário de 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (por exemplo, oleuropeína e tirosol) em azeite de oliva. Estas quantidades devem estar disponíveis em quantidades moderadas de azeite, no contexto de uma dieta equilibrada.*

- Manutenção das concentrações normais do sangue de HDL-colesterol (ID 1639) → *Com base nos dados apresentados, o Painel concluiu que as provas apresentadas não são suficientes para estabelecer uma relação de causa e efeito entre o consumo dos polifenóis do azeite de oliva (padronizado pelo conteúdo de hydroxytyrosol e seus derivados) e a manutenção de concentrações normais no sangue de HDL-colesterol.*

- Manutenção do normal pressão arterial (ID 3781) → *O Painel concluiu que não foi estabelecida uma relação de causa e efeito entre o consumo de polifenóis no azeite (de oliva, frutas águas residuais fábrica de azeite ou óleo de oliva, Olea europaea L. extrato e folhas) padronizado pelo seu conteúdo de hydroxytyrosol e seus derivados (por exemplo, complexo oleuropein) e a manutenção da pressão arterial normal.*

- "Propriedades anti-inflamatórias" (ID 1882) → *O Painel considerou que a redução da inflamação no contexto de doenças como a osteoartrite ou artrite reumatóide é um alvo terapêutico para o tratamento da doença, e não está em conformidade com os critérios estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 1924/2006*

- "Contribui para a saúde do trato respiratório superior" (ID 3468) → *O Painel concluiu que o efeito alegado é geral e não específico, e não se refere a qualquer alegação de saúde específica, conforme exigido pelo Regulamento (CE) n.º 1924/2006.*

- "Pode ajudar a manter a função normal do trato gastrointestinal" (ID 3779) → *O Painel concluiu que o efeito alegado é geral e não específico, e não se refere a qualquer alegação de saúde específica, conforme exigido pelo Regulamento (CE) n.º 1924/2006.*

- "Contribui para as defesas do organismo contra agentes externos" (ID 3467) → *O Painel concluiu que o efeito alegado é geral e não específico, e não se refere a qualquer alegação de saúde específica, conforme exigido pelo Regulamento (CE) n.º 1924/2006.*

Por suas características únicas, a Dieta Mediterrânica foi inscrita na Lista de Património Imaterial da Humanidade da UNESCO, em 2010, com a seguinte definição: “The Mediterranean diet constitutes a set of skills, knowledge, practices and traditions ranging from the landscape to the table, including the crops, harvesting, fishing, conservation, processing, reparation and, particularly, consumption of food. The Mediterranean diet is characterized by a nutritional model that has remained constant over time and space, consisting mainly of olive oil, cereals, fresh or dried fruit and vegetables, a moderate amount of fish, dairy and meat, and many condiments and spices, all accompanied by wine or infusions, always respecting the beliefs of each community (UNESCO, 2010)”. Em 2010, a lista dos países onde se pratica a dieta mediterrânica incluía Grécia, Itália, Marrocos e Espanha. A partir de 2013, Portugal, Chipre e Croácia foram também incluídos no inventário da UNESCO (Graça, 2014).

A difusão das informações científicas sobre os benefícios do azeite tem contribuído para o aumento do consumo mundial, o qual cresceu numa média de 1,9% ao ano nos últimos 15 anos, tendo passado de 2,413 milhões de toneladas na safra de 1998/99 para 3,137 milhões de toneladas em 2012/13 (Casa do Azeite, 2014).

A Espanha é actualmente o maior produtor mundial, cerca de 1 milhão de toneladas anuais. A produção localiza-se principalmente na Andaluzia, sobretudo na região de Jaén, e na Catalunha. As principais variedades de azeitona para azeite são Picual, Verdala e Manzanilla, na Andaluzia, e Arbequina e Real, na Catalunha. A Itália é o segundo produtor mundial (cerca de 600.000 toneladas anuais), estando a produção localizada principalmente na Sicília, Calábria e Puglia. As principais variedades de azeitona italiana para azeite são Frantoio, Leccino Pendolino, e Moraiolo. A Grécia é o terceiro produtor mundial de azeite (cerca de 350.000 toneladas anuais) sendo a

variedade Koroneiki, originária do Peloponeso, a mais conceituada azeitona grega para azeite (PROSODOL, 2011; OTG, 2014).

Portugal é actualmente o quarto maior produtor europeu de azeite, estendendo-se a área cultivada por cerca de 336 mil hectares (BES, 2013). A figura 3 mostra a quantidade produzida em 2011, aproximadamente 800.000 hectolitros (cerca de 72.000 toneladas), tendo esta produção ocorrido principalmente no Alentejo (ALE) (500.000 hL) e Trás-os-Montes (TM) (150.000 hL) e os 20% restantes distribuídos pelas outras regiões do país, sobretudo Beira Litoral (BL), Beira Interior (BI), Ribatejo & Oeste (RO) e entre Douro & Minho (EDM). Em Trás-os-Montes, uma oliveira produz, em média, 20 kg de azeitonas, sendo necessárias cerca de 5 a 6 kg de azeitonas para obter-se 1 L de azeite (CMM, 2007). A produção de azeite permite que uma parte seja exportada para diversos países, sendo o Brasil o principal importador, como se pode ver na figura 4, que mostra a exportação do azeite português por país de destino.

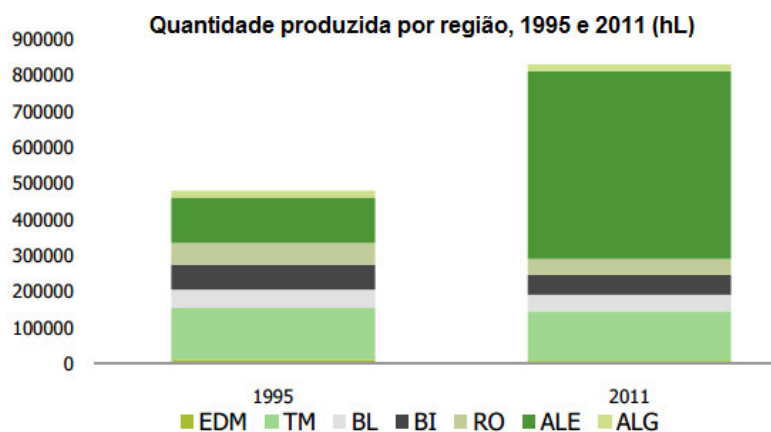


FIGURA 3. Produção (hL) de azeite em Portugal em 1995 e em 2011 (BES, 2013)

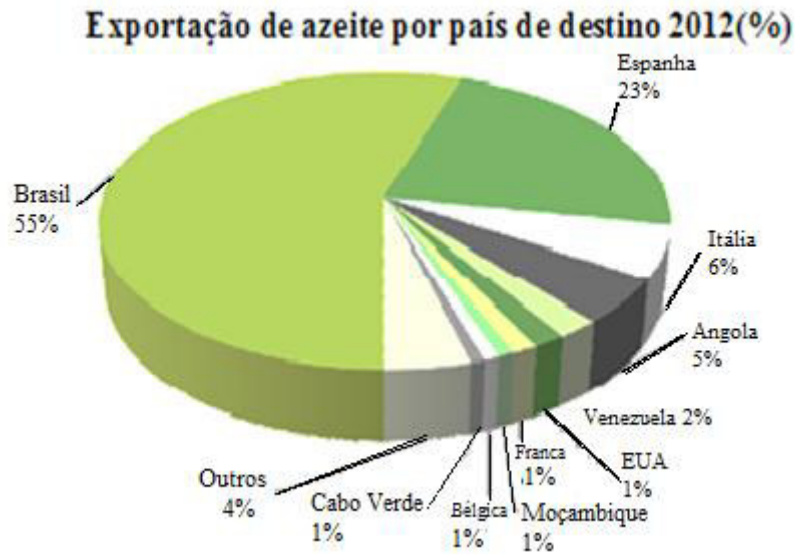


FIGURA 4. Exportação de azeite português em 2012, por país de destino (BES, 2013)

1.4 DESIGNAÇÕES DE PRODUTOS LÍQUIDOS DA AZEITONA

Na União Europeia, o Regulamento (CE) n° 1234/2007, do Conselho de 22 de Outubro de 2007, estabeleceu as 8 designações (nomeadamente, azeites virgens - 3 subcategorias, azeite refinado, azeite, óleo de bagaço de azeitona bruto, óleo de bagaço de azeitona refinado, óleo de bagaço de azeitona) e a respectiva descrição das características dos 8 diferentes produtos líquidos obtidos da azeitona, como se transcreve a seguir:

“DESIGNAÇÕES E DEFINIÇÕES DOS AZEITES E ÓLEOS DE BAGAÇO DE AZEITONA A QUE SE REFERE O ARTIGO 118.

1. AZEITES VIRGENS

Azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Estes azeites são exclusivamente classificados e descritos do seguinte modo:

a) *Azeite virgem extra*

Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

b) *Azeite virgem*

Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

c) *Azeite lampante*

Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g e/ou estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

2. AZEITE REFINADO

Azeite obtido por refinação de azeite virgem, com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 0,3 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

3. AZEITE — COMPOSTO POR AZEITE REFINADO E AZEITE VIRGEM

Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

4. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA BRUTO

Óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solventes ou por processos físicos, ou óleo correspondente, com excepção de certas características específicas, a um azeite lampante, com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza, e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

5. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA REFINADO

Óleo obtido por refinação de óleo de bagaço de azeitona bruto, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.

6. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA

Óleo obtido por loteamento de óleo de bagaço de azeitona refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g, estando as outras características conformes com as previstas para esta categoria.”

Para além das indicações sobre o modo de obtenção dos produtos líquidos obtidos da azeitona, acima descritas, a União Europeia também estabeleceu, através do Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, os critérios para a denominação de origem protegida (DOP) ou para a indicação geográfica protegida (IGP) de um determinado produto agrícola ou género alimentar. Em Portugal, o azeite de denominação de origem protegida (DOP) tem características histórico-culturais, de processamento, físico-químicas e organolépticas próprias de determinada região. É obrigatoriamente extraído e embalado na região de origem das azeitonas. As DOP são geridas pelo Agrupamento de Produtores da região e controladas e certificadas pelo Organismo Privado de Controlo de Certificação. Existem actualmente 6 regiões com denominação de origem protegida, nomeadamente DOP Alentejo Interior, DOP Beira Interior, DOP Moura, DOP Norte Alentejano, DOP Ribatejo e DOP Trás-os-Montes (CONFAGRI, 2008).

Adicionalmente, está também prevista a informação referente ao modo de produção das azeitonas, no rótulo do produto. Neste caso a mais valia refere-se à introdução do nome «biológico», se a produção tiver ocorrido sem o recurso a produtos químicos da era tecnológica, como fertilizantes e pesticidas. Os procedimentos e características relativos ao modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos

agrícolas e nos géneros alimentícios constam no Regulamento (CEE) nº 2092/91 do Conselho, de 24 de Junho de 1991.

1.5. PROCESSO DE FABRICO DO AZEITE VIRGEM

As etapas do processo industrial de produção de azeite virgem incluem a apanha da azeitona, o transporte para o lagar, a lavagem, a trituração da azeitona, a batedura, a centrifugação, o armazenamento e a filtração (Frankel, 2013). A figura 5 resume as etapas do processo (DREALentejo, 2013).

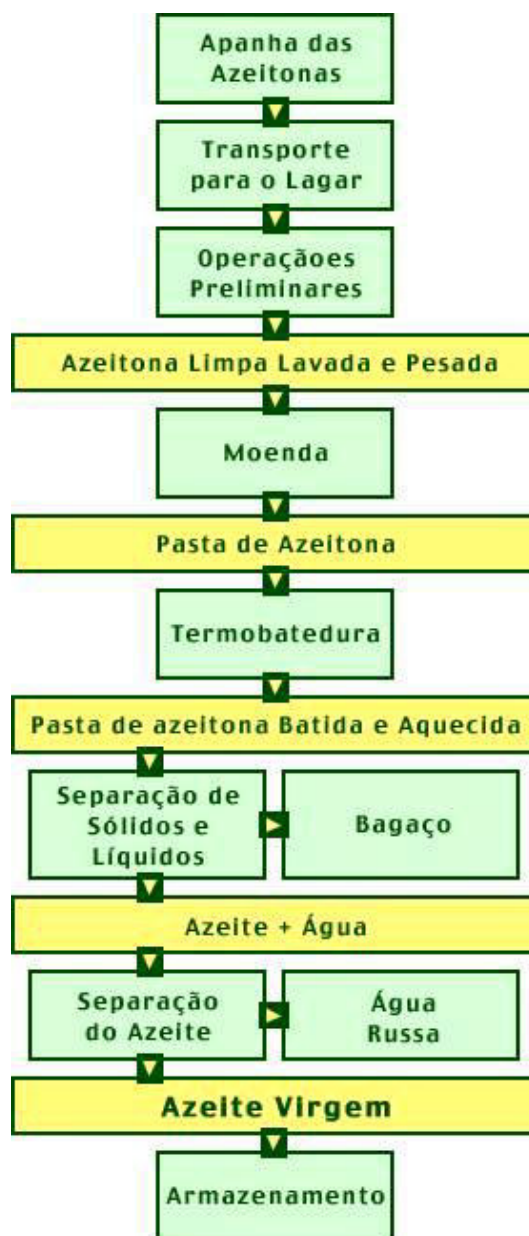


FIGURA 5. Etapas do processo de obtenção de azeite virgem (DREALentejo, 2013).

Para a obtenção de um azeite virgem de qualidade é necessário utilizar azeitonas recém-colhidas, exclusivamente provenientes da árvore, sãs, e que se encontrem no ponto

desejado de maturação. A figura 6 mostra o momento da apanha mecanizada de uma oliveira da variedade Cobrançosa, em Trás-os-Montes.



FIGURA 6. Apanha mecanizada da azeitona (foto Z. Morais, 2013)

O momento da apanha da azeitona é uma decisão importante que define em grande parte as propriedades do azeite final pois, devido aos vários processos metabólicos que vão ocorrendo no fruto ao longo do seu amadurecimento, a composição química da azeitona varia consoante o momento em que é colhida. As indicações comerciais das propriedades organolépticas do azeite virgem na União Europeia seguem o Regulamento (CE) nº 640/2008, que contempla os seguintes atributos na rotulagem: Frutado - com o qualificativo verde ou maduro, Amargo e Picante, complementados com os termos intenso, médio ou ligeiro e ainda Equilibrado e Doce (GPP, 2014). As combinações permitidas para estes atributos, por exemplo «frutado verde intenso» levam a cerca de 14 tipos organolépticos possíveis no rótulo de um azeite virgem.

Actualmente, o Conselho Oleícola Internacional, com sede em Madrid, atribui prémios anuais aos melhores azeites virgens tendo em conta apenas quatro categorias, nomeadamente Verde Intenso, Verde Médio, Verde Ligeiro e Maduro, as quais estão relacionadas com o grau de maturação da azeitona. Em 2014, Portugal foi galardoado com cinco prémios do COI, nomeadamente o 1º, 2º e 3º lugares na categoria Verde Ligeiro e o 1º e 2º lugares na categoria Verde Médio. Os produtores vencedores destes prémios foram, respectivamente: Sociedade Agrícola Vale de Ouro, S.A. - Ferreira de Alentejo, Elosua Portugal, S.A. – Azambuja, Cooperativa de Olivicultores de Valpaços,

C.R.L. – Valpaços, Casa Agrícola Roboredo Madeira, S.A. – CARM – Almendra, Gallo Worldwide – Lisboa (COI, 2014).

Depois da apanha, o transporte da azeitona ao lagar deve ocorrer rapidamente, de preferência no próprio dia, e em condições que conservem a integridade do fruto. No lagar deve existir um controlo exigente do estado de limpeza e higienização dos materiais que irão estar em contacto com o azeite, assim como das temperaturas utilizadas e de todos os passos da laboração e armazenamento (Santos, 2009).

Uma vez no lagar, a azeitona é pesada e lavada e depois passa para a fase de trituração (Fig. 7). A trituração da azeitona é processo físico que tem como objectivo libertar os óleos armazenados nas gotículas de polpa. O produto da trituração é designado pasta de azeitona.



FIGURA 7. Lavagem (à esquerda) e trituração (à direita) da azeitona (foto L. Serrano, 2013)

Actualmente, a pasta de azeitona é obtida em lagares industriais, seja com a tradicional e descontínua pedra moinho seja com a moderna e contínua trituradora de martelo (Fig 7 à direita). Esta última é usada principalmente nas indústrias onde a extracção do azeite é realizada por centrifugação. A trituração da azeitona é um dos passos mais importantes, no que respeita ao perfil fenólico de azeite virgem produzido, uma vez que, depois da azeitona estar triturada, várias enzimas envolvidas na geração e transformação dos compostos fenólicos podem ser activadas (Inarejos-García, Fregapane & Salvador, 2011; Servili, Sordini, Esposto, Urbani, Veneziani, Di Maio & Taticchi, 2013).

Segue-se a etapa de batedura, ou malaxagem, da pasta de azeitona, que realiza-se num equipamento de aço inoxidável constituído por uma cuba semicilíndrica com um eixo horizontal, braços rotativos, e lâminas de diferentes formas e tamanhos (Fig. 8). Esta cuba é equipada com uma camisa de aquecimento onde há circulação de água quente

para aquecer a pasta de azeitona. A batidura proporciona a aproximação das pequenas gotículas de azeite de forma que estas gotículas se unam em gotas maiores até constituírem uma fase líquida contínua. A eficiência desta etapa depende das características da pasta de azeitona e dos parâmetros tecnológicos da operação tais como temperatura e tempo, os quais devem ser correctamente balanceados pois um tempo alongado de batidura pode promover a extracção do óleo mas também a sua oxidação, diminuindo a validade do produto final, pelo que, em geral, decorre durante 20-40 minutos (Di Giovacchino, Costantini, Ferrante, & Serraiocco, 2002; Clodoveo, 2012). A temperatura da batidura também é fundamental para a qualidade do azeite pois temperaturas elevadas podem favorecer a solubilização dos compostos fenólicos na fase oleosa mas, por outro lado, proporcionam a perda dos ésteres voláteis que dão bom aroma ao azeite. A temperatura adequada situa-se entre 25 e 30 °C (Greenfood, 2010).



FIGURA 8. Batedeira, vista superior (à esquerda) e vista lateral (à direita) (foto L. Serrano, 2013)

Por fim, os constituintes líquidos e a pasta de azeitona são separados por prensagem ou por centrifugação. Na primeira, são usadas prensas sujeitas a uma elevada pressão que separam o azeite e a água da pasta sólida; o azeite é posteriormente separado da água por processos de decantação. Na segunda, uma técnica mais recente, o movimento de rotação a alta velocidade permite separar o azeite das restantes partes (Fig. 9).



FIGURA 9. Centrifugas horizontais, vista geral (à esquerda) e centrífuga vertical (à direita) (foto L. Serrano, 2013)

A etapa de centrifugação é geralmente utilizada como uma separação primária da fracção de azeite do material sólido. Esta etapa pode ser realizada usando a combinação de dois sistemas diferentes: centrifugação horizontal (de três e de duas fases) e centrifugação vertical. A centrifugação horizontal de três fases utiliza um decantador que necessita que se adicione água quente para diluir a pasta de azeitona e facilitar a separação (Salvador, Aranda, Gómez-Alonso & Fregapane, 2003) enquanto na centrifugação horizontal de duas fases não é necessário a adição de água quente. Contudo, deve-se ter em conta que o sistema de duas fases requer um valor mínimo de humidade na pasta de azeitona (aproximadamente 50 %), a fim de facilitar o processo de separação (Gimeno, Castellote, Lamuela-Raventós, De la Torre & López-Sabater, 2002).

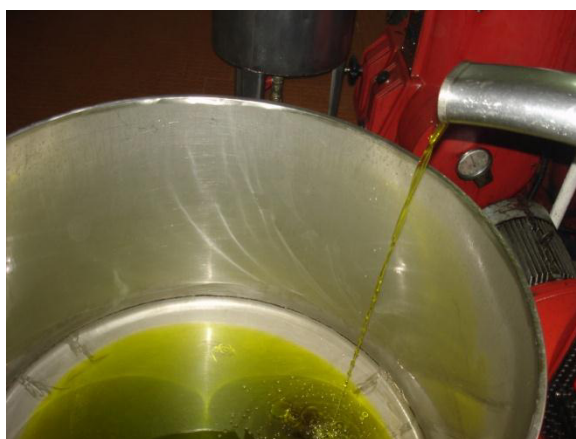


FIGURA 10. Produto final, azeite virgem (foto L. Serrano, 2013)

Na área do Mediterrâneo, o azeite é geralmente produzido a partir de Setembro e armazenado até filtração e comercialização a partir de Fevereiro (Fig. 10). Para além do aspecto mais transparente do produto filtrado, não estão comprovados benefícios

adicionais da filtração do azeite (Fregapane, Lavelli, León, Kapuralin & Desamparados Salvador, 2006).

Os subprodutos da produção de azeite estão classificados segundo o modo de extracção utilizado. Pelo sistema tradicional de prensagem e pelo sistema de centrifugação em 3 fases, mais utilizados em Portugal, existem dois resíduos sendo um deles um líquido preto e malcheiroso denominado água-ruça e o outro um sólido constituído por uma mistura de caroços, peles e celulose, denominado bagaço de azeitona. Eventualmente, esta mistura sólida é reprocessada para remoção de óleo residual; se for submetida apenas a prensagem, o óleo obtido é denominado óleo de bagaço de azeitona; no caso da extracção realizar-se com solventes orgânicos, designa-se o óleo por óleo de bagaço de azeitona refinado (Regulamento CE 1234/2007).

Modernamente têm-se realizado estudos com vista ao tratamento e valorização das águas-ruças. Uma solução pouco dispendiosa, mais recomendada aos pequenos produtores, é a neutralização do seu pH ácido por acção da cal hidratada, ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ou do carbonato de cálcio (CaCO_3), e utilização subsequente como água de rega. Outra possibilidade é a evaporação da água, em lagoas construídas para o efeito, e a comercialização do resíduo sólido, depois de seco, como condicionador do solo ou como combustível (incineração) (Ferraz, 2012).

Em Espanha, o modo de extracção é principalmente o sistema de centrifugação em 2 fases, o que leva a um resíduo pastoso único denominado "alperujo" ou "bagaço de duas fases", que tem um conteúdo de água mais elevado e é mais difícil de tratar do que os resíduos sólidos tradicional (Gallardo-Guerrero, Roca & Mínguez-Mosquera, 2002).

1.6. COMPOSIÇÃO DO AZEITE

O azeite é constituído essencialmente pelos componentes da azeitona insolúveis em água, dos quais aproximadamente 98% são triacilgliceróis, TAG, ésteres de ácidos gordos e glicerol (*Codex Alimentarius*, 2003). O TAG mais abundante do azeite é a trioleína (Fig. 11). A classificação tradicional dos constituintes do azeite é dada pelo seu comportamento na reacção de saponificação, em que promove-se o refluxo do azeite com hidróxido de potássio etanólico seguido da adição de água originando duas fases: uma fase aquosa, denominada saponificável, onde localizam-se os componentes

maioritários – sobretudo sais dos ácidos gordos, resultantes da hidrólise dos TAGs, glicerol, fosfolípidos e compostos fenólicos polares - e uma fase orgânica, denominada insaponificável, que contém os componentes minoritários do azeite - hidrocarbonetos, álcoois, polifenóis, tocoferóis, esteróis, ceras, pigmentos e compostos voláteis, entre outros (APA-PE, 2012).

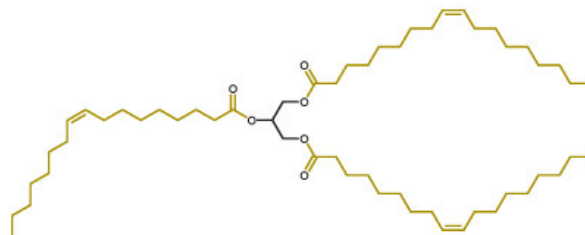


FIGURA 11. Estrutura da trioleína, OOO.

1.6.1 CONSTITUINTES MAIORITÁRIOS, A FRACÇÃO SAPONIFICÁVEL

A tabela 2 apresenta as gamas de percentagem relativa dos principais ácidos gordos do azeite virgem, azeite refinado e óleo de bagaço de azeitona refinado, segundo o *Codex Alimentarius* (2003). Como pode ver-se, os ácidos gordos maioritários são o oleico (55%-83%), o palmítico (7,5%-20%) e o linoleico (3,5%-21,0%), nos três produtos que, de resto, são muito semelhantes no perfil geral dos ácidos gordos, excepto quanto aos ácidos gordos *trans* que estão presentes em gamas muito superiores no azeite refinado e no óleo de bagaço de azeitona refinado, comparativamente ao azeite virgem.

TABELA 2. Composição em ácidos gordos do azeite virgem, azeite refinado e óleo de bagaço de azeitona refinado (*Codex Alimentarius*, 2003)

	Azeite virgem	Azeite refinado	Óleo de bagaço de azeitona refinado
Ácidos Gordos			
C 14:0	0,0-0,05	0,0-0,05	0,0-0,05
C 16:0	7,5-20,0	7,5-20,0	7,5-20,0
C 16:1	0,3-3,5	0,3-3,5	0,3-3,5
C 17:0	0,0-0,3	0,0-0,3	0,0-0,3
C 17:1	0,0-0,3	0,0-0,3	0,0-0,3
C 18:0	0,5-5,0	0,5-5,0	0,5-5,0
C 18:1	55,0-83,0	55,0-83,0	55,0-83,0
C 18:2	3,5-21,0	3,5-21,0	3,5-21,0
C 18:3 ⁴			
C 20:0	0,0-0,6	0,0-0,6	0,0-0,6
C 20:1	0,0-0,4	0,0-0,4	0,0-0,4
C 22:0	0,0-0,2	0,0-0,2	0,0-0,3
C 24:0	0,0-0,2	0,0-0,2	0,0-0,2
<i>trans</i> -Ácidos Gordos			
C 18:1 T	0,0-0,05	0,0-0,20	0,0-0,40
C 18:2 T + C 18:3 T	0,0-0,05	0,0-0,30	0,0-0,35

Os azeites virgem extra contêm um largo espectro de compostos fenólicos hidrofílicos que inclui os ácidos fenólicos, tais como os ácidos gálico e ferúlico, os secoiridoides, como a oleuropeína (Fig. 12), os álcoois fenólicos, como o hidroxitirosol e o tirosol (Fig. 12) e os flavonóides, como a luteolina e a rutina. Os teores médios destes componentes fenólicos não são iguais em todos os azeites pois dependem de muitos factores como a variedade da azeitona, o clima, o solo, o regime de irrigação, o grau de maturação do fruto e o processo de elaboração (Gouvinhas, Machado, Gomes, Lopes, Martins-Lopes & Barros, 2014). Vários estudos relacionam os compostos fenólicos hidrofílicos do azeite a propriedades benéficas à saúde tais como a capacidade antioxidante (Covas, Konstantinidou, & Fitó, 2009).

A tabela 3 mostra as áreas cromatográficas médias de 15 compostos fenólicos hidrofílicos/polares identificados, e 2 não identificados, em azeites virgem extra portugueses monovarietais e de mistura (Gouvinhas, Machado, Gomes, Lopes, Martins-Lopes & Barros, 2014). Os compostos fenólicos polares foram obtidos por extracção do azeite virgem extra, com hexano/metanol/água, seguida de centrifugação e injeção da fase mais densa (aquosa) em HPLC. Como pode ver-se, nos azeites monovarietais, os três compostos mais abundantes foram o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico e a oleuropeína. Por outro lado, nos azeites de mistura os três mais abundantes foram a oleuropeína, o hidroxitirosol e o tirosol - estruturas na figura 12. No geral, os autores encontraram que os azeites comerciais de mistura de variedades possuíam uma maior concentração de compostos fenólicos polares, e uma maior actividade antioxidante, que os azeites monovarietais. Num outro estudo com amostras produzidas em Portugal, mas utilizando apenas as azeitonas no estado de fruto, encontraram-se diferenças significativas nos teores de hidroxitirosol e oleuropeína, consoante a variedade em causa. Por exemplo, para a variedade Lentisca foi encontrado um teor médio de 27.673 mg/kg de hidroxitirosol e 21.681 mg/kg de oleuropeína enquanto para a variedade Borrenta estes teores foram 2781 e 388, respectivamente (Vinha, Ferreres, Silva, Valentao, Gonçalves, Pereira ... & Andrade, 2005). Estas diferenças podem dever-se ao facto do hidroxitirosol também ocorrer na forma de derivados. Por exemplo, em 2008, foi isolado em Portugal um novo derivado do hidroxitirosol, o qual recebeu a designação de «3,4-dihydroxyphenylethyl [(2,6-dimethoxy-3-ethylidene)-tetrahydropyran-4-yl]acetate (3,4-DHPEA-DETA)» (Paiva-Martins & Pinto, 2008).

Uma vez que hidroxitirosol é às vezes considerado como um produto de degradação da oleuropeína, poderia supor-se que a oleuropeína decresce durante a maturação; esta suposição não foi comprovada no estudo de Vinha *et al* (2005). Na verdade, valores mais elevados de índice de maturação, MI, não apresentaram maiores valores para o quociente hidroxitirosol/oleuropeína e não foram encontradas correlações entre o MI e o conteúdo em hidroxitirosol, dentro do mesmo cultivar.

TABELA 3. Áreas cromatográficas médias dos compostos fenólicos presentes em amostras de azeites monovarietais e de azeites comerciais de mistura de variedades (Gouvinhas *et al*, 2014)

Compound	Monovarietal samples area	Comercial samples area
Hydroxytyrosol	3.02 ± 0.12	39.41 ± 2.85
Tyrosol	21.37 ± 1.70	29.97 ± 1.89
Vanillic acid	3.51 ± 0.54	6.87 ± 0.86
Caffeic acid	9.59 ± 1.23	2.23 ± 0.23
Syringic acid	12.92 ± 0.98	9.67 ± 1.11
<i>p</i> - Coumaric acid	43.29 ± 3.01	5.69 ± 1.21
Hydroxytyrosol acetate	2.69 ± 0.10	3.59 ± 0.89
Ferulic acid	39.24 ± 2.89	1.17 ± 0.34
<i>o</i> -coumaric acid	7.90 ± 1.29	6.38 ± 0.90
Oleuropein aglycon dicarboximethylated	8.10 ± 0.92	9.64 ± 2.04
Oxidized dialdehyde of oleuropein	19.03 ± 2.04	14.55 ± 1.34
Oleuropein aglycon dialdehyde dicarboximethylated	20.17 ± 1.67	8.70 ± 1.18
Oleuropein	31.41 ± 3.05	41.83 ± 3.13
Oleuropein aglycon dialdehyde	22.36 ± 2.31	22.78 ± 1.19
Luteolin	19.65 ± 2.13	24.74 ± 1.31
Not indentified	58.09 ± 4.07	1090 ± 3.30
Not indentified	44.31 ± 3.63	3.68 ± 0.88

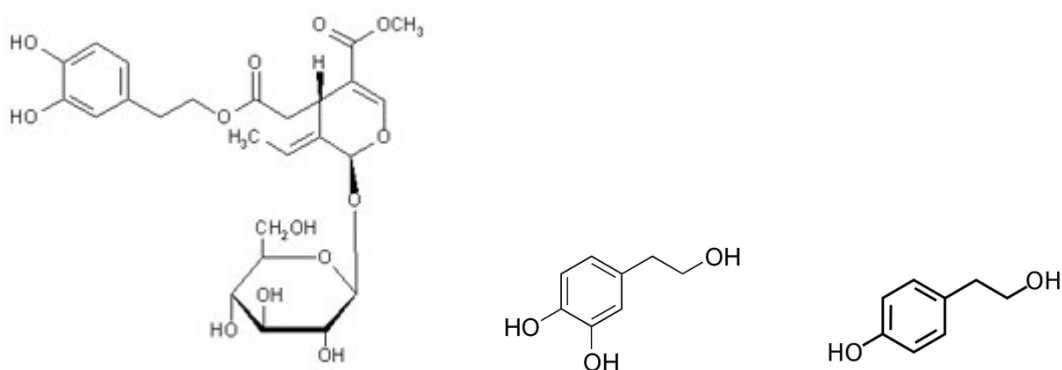


FIGURA 12. Compostos fenólicos hidrofílicos. Da esquerda para a direita: estruturas da oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol

1.6.2 CONSTITUINTES MINORITÁRIOS, A FRACÇÃO INSAPONIFICÁVEL

A figura 13 apresenta uma distribuição percentual frequente das famílias químicas presentes na fracção insaponificável do azeite, sendo que os hidrocarbonetos

representam 30-50%, os álcoois triterpénicos 19-34%, os polifenóis e outros fenólicos lipofílicos 18-37% e os tocoferóis 2-3%. Outros componentes, como pigmentos, voláteis, ceras, enzimas e outras vitaminas, comparecem em percentagens inferiores (APA-PE, 2012).

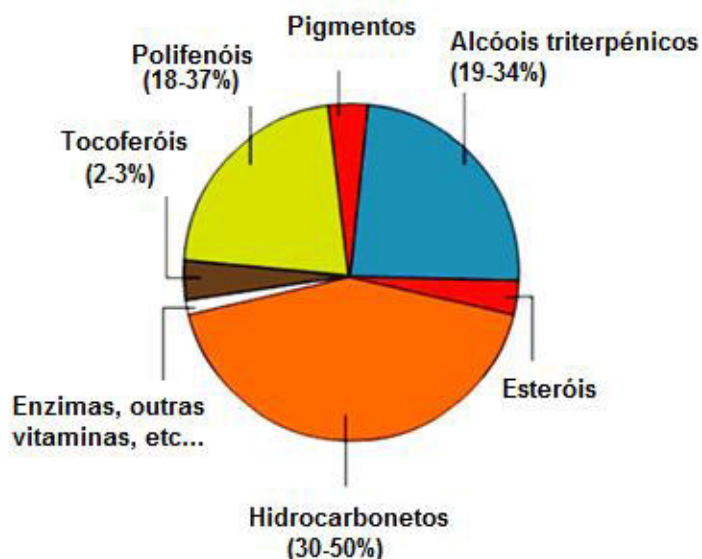


FIGURA 13. Composição química da fracção insaponificável do azeite (adaptado de APA-PE, 2012)

Hidrocarbonetos

Representam a fracção maioritária dos insaponificáveis. Alguns autores apresentam os hidrocarbonetos como sendo aproximadamente 30-50% da fracção insaponificável (APA-PE, 2012) e outros como correspondente a 1,5 a 8,0 g/kg de azeite (Ramirez-Tortosa, Granados, Quiles & Yaqoob, 2006). Os seus integrantes ocorrem na forma de hidrocarbonetos terpénicos como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) sendo a fracção dos triterpenos, representada sobretudo pelo esqualeno (Fig. 14), a mais abundante, correspondendo a 1,25-7,5 g/kg azeite (Ramirez-Tortosa et al, 2006). São também de destacar os carotenóides, tetraterpenos que, pelo elevado número de duplas ligações, apresentam cores que vão do amarelo até ao vermelho e, por isso, também podem ser enquadrados na categoria dos pigmentos. Na avaliação dos carotenóides maioritários em 25 azeites portugueses, Maia (2012) encontrou um valor médio de 5,0 mg/kg de β -caroteno e 2,4 mg de luteína, por kg de azeite (Fig 14).

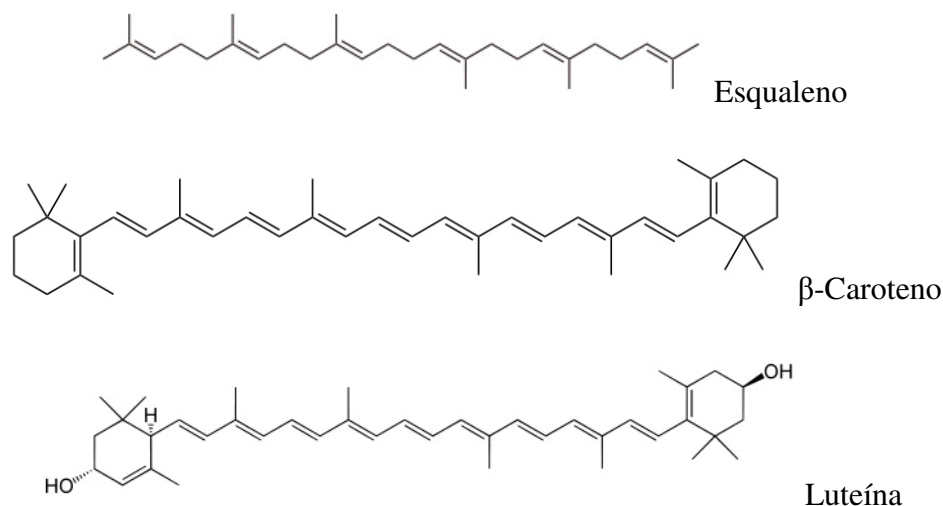


FIGURA 14. Estruturas de hidrocarbonetos abundantes no azeite. Esqualeno, um tripterpeno, $C_{30}H_{50}$, precursor dos esteróides. Beta-caroteno e luteína, tetraterpenos, carotenóides.

Alcoois triterpénicos

O eritrodíol e uvaol, são álcoois triterpénicos que possuem quatro anéis hexagonais condensados (Fig. 15). Ocorrem na polpa e pele da azeitona, e, devido ao processo de extração mecânica, têm uma presença natural no azeite; porém, no azeite virgem extra, o teor de eritrodíol e uvaol não deve ultrapassar 4,5% (Regulamento (UE) nº 61/2011, 2011).

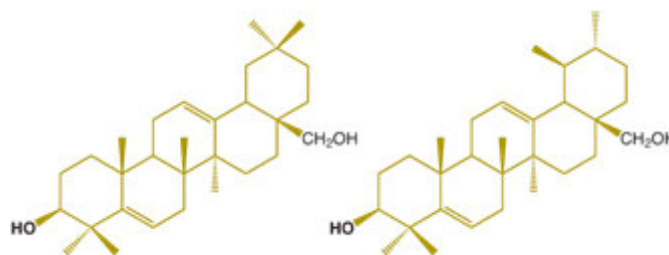


FIGURA 15. Estruturas dos isómeros eritrodíol, à esquerda, e uvaol, à direita.

Polifenóis lipofílicos e compostos fenólicos lipofílicos

Os azeites virgem extra contêm também um largo espectro de polifenóis lipofílicos e compostos fenólicos lipofílicos como, por exemplo, os ácidos tânicos e o oleocantal, respectivamente (Fig. 16). Este último foi referido na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (des Gachons, Uchida, Bryant, Shima, Sperry, Dankulich-Nagrudny,... & Breslin, 2011).

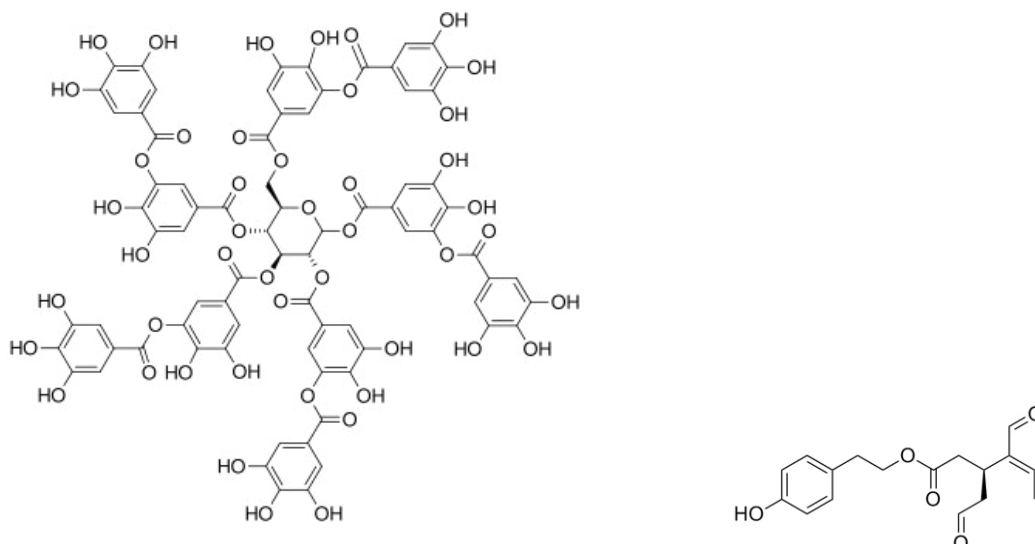


FIGURA 16. À esquerda, estrutura de um ácido tânico, um polifenol lipofílico. À direita, estrutura do oleocantal, um composto fenólico lipofílico.

Tocoferóis

Embora os tocoferóis sejam também compostos fenólicos lipofílicos, são tradicionalmente abordados à parte, talvez devido à sua acção vitamínica nos humanos. O representante mais abundante no azeite é o alfa-tocoferol (Fig. 17). No total representam cerca de 2-3% da fracção insaponificável (APA-PE, 2012).

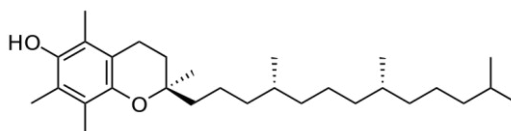


FIGURA 17. Estrutura do alfa-tocoferol, o mais abundante tocoferol do azeite, um composto fenólico lipofílico.

Esteróis

Os esteróis são álcoois de esteróides, possuem quatro anéis condensados - três hexagonais e um pentagonal - que desempenham funções bioquímicas em plantas e animais. No azeite virgem extra, os esteróis totais atingem valores iguais ou superiores a 1000 mg/kg sendo o sitosterol o principal esteroide do azeite, correspondente a mais de 93% do total (Fig. 18) (Regulamento (UE) nº 61/2011, 2011).

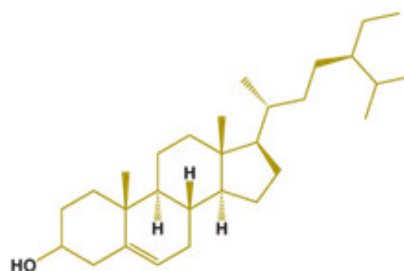


FIGURA 18. Estrutura do sitosterol, um esteroide.

Ceras e Álcoois alifáticos

As ceras são os ésteres de ácidos gordos com álcoois gordos alifáticos, por exemplo oleato de oleilo, um éster C36 (Fig. 19). Estes compostos ocorrem naturalmente na pele da azeitona e protegem o fruto contra a desidratação, durante as secas. No azeite virgem extra, são considerados normais os teores de cera inferiores a 250 mg/kg (Regulamento (UE) n° 61/2011, 2011).

Os álcoois alifáticos mais abundantes no azeite são álcoois gordos de cadeia linear, sobretudo o hexacosanol, $C_{26}H_{53}OH$, o octacosanol $C_{28}H_{57}OH$ e o tetracosanol, $C_{24}H_{49}OH$, os quais podem, em combinação com ácidos C18, levar a ceras C44, C42 e C46, respectivamente. Segundo Kiritsakis & Christie (2000), o teor de álcoois alifáticos no azeite pode variar entre 100 e 700 mg/kg.

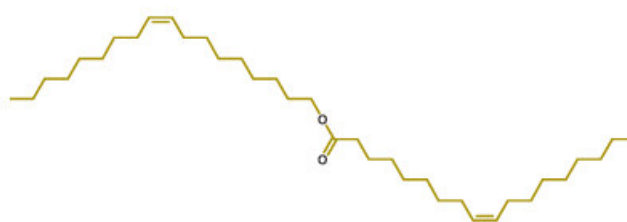


FIGURA 19. Estrutura do oleato de oleilo, um éster C36.

Pigmentos

O azeite contém dois tipos de pigmentos: os caratenóides, já referidos, e as clorofilas. Da classe das clorofilas, estão presentes no azeite as clorofilas a e b, responsáveis pela sua coloração verde, sendo maioritária a clorofila a, cerca de 80% (Fig. 20). O teor em clorofila é característico da variedade da azeitona, por exemplo nas variedades espanholas, a variedade Arbequina contém em média 4,9 mg/kg de clorofilas totais enquanto na Picual podem ocorrer teores de 7,2 a 24,4 mg/kg, consoante a região geográfica. O processo de extração do azeite e a respectiva armazenagem influenciam o seu conteúdo clorofilino (Giuliani, Cerretani & Cichelli, 2011).

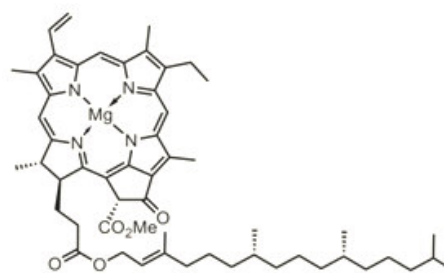


FIGURA 20. Estrutura da clorofila a.

Para além das características próprias de cada variedade, o teor de clorofila de um azeite depende do índice de maturação das azeitonas. Pelo método descrito em Hermoso *et al.* (1991), para determinar-se o índice de maturação, MI, são tomadas aleatoriamente 100 azeitonas de cada amostra e a seguir procede-se à sua classificação numa das seguintes

categorias: 0 - azeitonas com epiderme verde intensa ou verde escura; 1 - azeitonas com epiderme amarela ou verde amarelada; 2 - azeitonas com epiderme amarelada, mas com manchas avermelhadas em menos que a metade da área do fruto; 3 - azeitonas com epiderme avermelhada ou violeta claro em mais que metade do fruto; 4 - azeitonas com epiderme negra e polpa totalmente branca; 5 - azeitonas com epiderme negra e polpa menos de 50% púrpura; 6 - azeitonas com epiderme negra e violeta (mais de 50%) ou polpa púrpura; 7 - azeitonas com epiderme preta e polpa totalmente escura.

Sendo o número de frutos em cada categoria representado de «A a H», tem-se que o índice de maturação, $MI = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7)/100$. Como pode ver-se pela descrição da determinação do MI, apenas os azeites feitos com azeitonas nos estágios de maturação 0 e 1 vão apresentar elevados teores de clorofila.

Compostos Voláteis

Um estudo de 2012 sobre os voláteis de azeites virgem extra de Trás-os-Montes, Moura, Norte Alentejano e Beira Baixa indicou os aldeídos, ésteres e álcoois como as famílias químicas mais abundantes. Nestas, verificou-se uma maior abundância em compostos com seis carbonos, nomeadamente o (*E*)-hex-2-enal e o acetato de *Z*-3-hexenilo. Dentre os compostos C5 destacou-se o dímero de penteno 3-etl-1,5-octadieno e para os C4 o mais concentrado foi o 2-metilbutanal. Foram ainda detectados monoterpénos mas geralmente em baixas percentagens (1,0% a 8,0%) (Custódio, 2012). A caracterização do aroma dos azeites virgem extra das variedades Galega Vulgar e Cobrançosa na Beira Baixa reafirmou o (*E*)-hex-2-enal como o composto mais abundante (Peres, Jeleń, Majcher, Arraias, Martins & Ferreira-Dias, 2013).

1.7 PARÂMETROS DE CONFORMIDADE PARA AS CATEGORIAS DOS PRODUTOS LÍQUIDOS DA AZEITONA

Tal como já referido no tópico 1.4, a União Europeia actualmente reconhece 8 categorias de produtos líquidos da azeitona. As suas características específicas, reveladas pelos valores paramétricos, constam no anexo I do Regulamento (UE) nº 61/2011, apresentado nas figuras 21 e 22. Como pode ver-se, estão regulados 28 parâmetros, sendo 26 químicos e 2 sensoriais. Em Portugal, o laboratório de referência para as análises químicas e sensoriais, com painel de provadores de azeite virgem acreditado pelo Conselho Oleícola Internacional, é o Laboratório de Estudos Técnicos,

do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, em funcionamento há cerca de 30 anos (LET-ISA-UL, 2014). A seguir descrevem-se brevemente os princípios e a razão de ser dos parâmetros seleccionados, tendo em conta o azeite virgem extra.

Ésteres metílicos (FAMES) e etílicos (FAEEs) dos ácidos gordos.

A detecção de ésteres metílicos e etílicos de ácidos gordos do azeite com valores superiores ao paramétrico podem ser indicativos de um tratamento / processamento incorrecto da matéria-prima (azeitonas) e/ou de ocorrência de processos de desodorização, para eliminar odores indesejáveis produzidos por microorganismos (APA-PE, 2012). Relativamente a este parâmetro, um azeite virgem extra deve estar em conformidade com pelo menos uma das duas seguintes restrições: $\Sigma (\text{FAME} + \text{FAEE}) \leq 75 \text{ mg/kg}$ ou $75 \text{ mg/kg} < \Sigma (\text{FAME} + \text{FAEE}) \leq 150 \text{ mg/kg}$ e $(\text{FAEE}/\text{FAME}) \leq 1,5$.

Acidez

A acidez é o parâmetro de qualidade mais conhecido e refere-se aos ácidos gordos livres, devido a hidrólise dos triacilgliceróis. O teor de acidez está principalmente relacionado com o estado de sanidade da azeitona no momento da extracção e portanto dá indicações sobre a qualidade da apanha, transporte e armazenamento até a extracção (APA-PE, 2012). A acidez máxima do azeite virgem extra é 0,8%, expressa em ácido oleico.

Índice de peróxidos

O azeite é susceptível de oxidação, que altera os seus ácidos gordos assim como os diversos ingredientes secundários que contribuem para o sabor, aroma e propriedades antioxidantes. O índice de peróxido é um parâmetro que expressa tais oxidações. Ácidos gordos insaturados sofrem oxidação através da formação de hidroperóxidos. O índice de peróxido mede o oxigénio activo na amostra (APA-PE, 2012). Para azeites virgens, não deve exceder 20 miliequivalentes de oxigénio por quilograma de azeite, meqO₂/kg.

Ceras

Teores de cera superiores ao valor paramétrico podem ser indicativos de utilização de óleo de bagaço de azeitona e/ou do uso de solventes no processo de extracção. O teor máximo de ceras nos azeites virgem e virgem extra é $\leq 250 \text{ mg/kg}$, no lampante é ≤ 300

mg/kg e no azeite refinado ≤ 350 mg/kg. Os óleos de bagaço apresentam mais de 350 mg de cera por kg de produto. A análise das ceras realiza-se por cromatografia em fase gasosa, GC-FID, simultaneamente com os FAMES e FAEEs. A análise das ceras, conjuntamente com a análise dos álcoois alifáticos, é também necessária para distinguir o azeite lampante do óleo de bagaço de azeitona (APA-PE, 2012).

Monopalmitato de 2-glicerilo

Nos azeites virgens, apenas uma pequena percentagem do ácido palmítico presente está ligado na posição 2. Por outro lado, nos óleos esterificados artificialmente a ligação com glicerol ocorre de uma forma aleatória, o que aumenta significativamente esta percentagem. O valor paramétrico do monopalmitato de 2-glicerilo é $\leq 0,9\%$, se % de ácido palmítico total $\leq 14\%$, e $\leq 1,0\%$, se % ácido palmítico total $> 14\%$. A concentração de monopalmitato de 2-glicerilo é determinada após a digestão enzimática específica, que elimina os ácidos gordos na posição 1 e 3, e subsequente análise por GC-FID de monogliceróis (APA-PE, 2012).

Estigmastadieno

O estigmastadieno é um produto de desidratação do β -sitosterol, que ocorre aquando do tratamento térmico do azeite. Valores de estigmatadieno superiores ao paramétrico são indicativos de processo de refinação (Boudalis & Liatsi, 2013). Para os azeites virgem e virgem extra, o valor paramétrico é $\leq 0,10$ mg/kg e para o azeite lampante é $\leq 0,50$ mg/kg.

Diferença entre o ECN42 determinado por HPLC e o ECN42 obtido por cálculo teórico

Δ ECN42. Para classificar os triacilgliceróis, TAG, de um alimento, adoptou-se o parâmetro ECN, número equivalente de carbono, que corresponde ao número total de carbonos dos seus ácidos gordos menos duas vezes o número total de ligações duplas. As análises revelaram que o azeite possui TAGs com ECNs de 44, 46, 48 e 50 mas praticamente nenhum TAG com ECN de 42. Por exemplo, o ECN do TAG mais abundante do azeite, trioleína é 48. Devido a esta constatação, que demonstrou ser um bom marcador da pureza do azeite, a diferença, Δ , entre o ECN42 teórico (calculado a partir do perfil de ácidos gordos obtido por cromatografia gasosa) e o ECN42 experimental (derivado de cromatografia líquida de alta pressão) foi incorporada no regulamento do azeite comercializável, com a designação Δ ECN42, e permite controlar

a fraude de mistura de outros óleos que não azeite (Boudalis & Liatsi, 2013). No caso dos azeites virgem e virgem extra, ΔECN_{42} deve ser menor ou igual a 0,2. Para os azeites lampante e refinado, ΔECN_{42} deve ser menor ou igual a 0,3.

K 232, K 270, Delta-K

Os hidroperóxidos produzidos durante as fases iniciais de oxidação podem sofrer oxidações adicionais, geralmente associadas a processos térmicos. Os hidroperóxidos de ácidos gordos di-insaturados, por exemplo o linoleico, dão origem a dienos conjugados, e os hidroperóxidos de ácidos gordos tri-insaturados, por exemplo o α -linolénico, dão origem a trienos conjugados. Dienos conjugados absorvem a 232 nm e trienos conjugados a 270 nm. A intensidade destas absorções é quantificada através dos índices K232 e K270. Quanto maiores estes coeficientes, mais ampla é a oxidação.

Um índice adicional, Delta-K ou ΔK , também é usado para medir tanto a oxidação como a pureza, e é definido como: $[\text{K}270 - ((\text{K}266 + \text{K}274)/2)]$. Por definição, ΔK pode assumir valores negativos se $[(\text{K}266 + \text{K}274) / 2 > \text{K}270]$. Isto acontece quando o espectro de UV do azeite tem uma curvatura para baixo em torno de 270 nm, o que indica um azeite muito fresco e bem preservado que não tem absorvâncias nessa região. Valores de K 232, K 270, Delta-K superiores aos paramétricos do azeite virgem extra (Fig. 21) podem ser indicativos de adição de azeite refinado, na fase do embalamento do produto, ou de oxidação secundária, na fase de armazenamento (APA-PE, 2012; Boudalis & Liatsi, 2013).

Exames organolépticos: Mediana dos defeitos (Md) e Mediana do frutado (Mf)

Um azeite é classificado como virgem extra quando, simultaneamente, a mediana dos defeitos é igual a zero e a mediana do frutado é superior a zero. Segundo o ANEXO XII do Regulamento (CE) nº 640/2008, a avaliação das características sensoriais dos azeites virgens é realizada por um júri experiente, constituído por um presidente e oito a doze provadores, em conformidade com o guia do Conselho Oleícola Internacional, COI.

Teores dos ácidos: Mirístico, Linolénico, Araquídico, Eicosenónico, Beénico e Lignocérico

A presença dos ácidos gordos minoritários, acima referidos, em percentagens superiores aos seus valores paramétricos (Fig. 22) é indicativa de adulteração do azeite com óleos de diferentes sementes (APA-PE, 2012).

Soma dos isómeros transoleicos (%) e Soma dos isómeros translinoleicos + translinolénicos

Os ácidos gordos insaturados em azeite são do tipo *cis*. Isómeros *trans* de ácidos gordos são formados durante as reacções de isomerização que ocorrem durante a refinação do azeite. Portanto, a presença de isómeros *trans* de ácidos gordos em valores acima do paramétrico é indicação de ocorrência de processo de refinação (Boudalis & Liatsi, 2013). Para os azeites virgem e virgem extra, os isómeros transoleicos não devem ultrapassar 0,05% do total dos ácidos presentes e a soma dos isómeros translinoleicos + translinolénicos também não deve ultrapassar 0,05%.

Composição esterólica (Colesterol, Brassicasterol, Campesterol, Estigmasterol, Betasitosterol e Delta-7- estigmastenol) e Esteróis totais

Os esteróis do azeite possuem um perfil qualitativo e quantitativo característico. A detecção dos esteróis seleccionados em quantidades superiores ao valor paramétrico, juntamente com a somatória dos esteróis totais (≤ 1000 mg/kg), indica adulteração do azeite com outros óleos (Boudalis & Liatsi, 2013).

Eritrodiol e uvaol

O eritrodiol e uvaol ocorrem na polpa e pele da azeitona e têm uma pequena presença natural no azeite. No entanto, a sua presença é muito maior se se proceder à extracção do azeite com solvente orgânico, pelo que, valores de eritrodiol e uvaol superiores ao paramétrico indicam azeite extraído com solvente, em oposição ao padrão de extracção mecânica (Boudalis & Liatsi, 2013). O valor paramétrico dos azeites é $\leq 4,5\%$.

Monitorização, ao longo de 12 meses, dos teores de peróxidos, aldeídos e clorofila de azeites virgem extra, monovarietais e de mistura, produzidos em Portugal e armazenados em 4 diferentes condições

CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES												
Categoria	Exames analíticos de ácidos gordos (FAME) e ácidos esfílicos de ácidos gordos (FAEE)		Índice de peróxidos mEq O ₂ /kg (1)	Caras mg/kg (2)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Esajoma azar-diano mg/kg (3)	Diferença entre o BCM 2 determinado por HPLC e o BCM 2 obtido por cálculo teórico	K ₂₃₂ (1)	K ₂₃₂ (1)	Dekal-K (1)	Exame organoléptico Mediana dos defeitos (Md) (1)	Exame organoléptico Mediana do frutado (Mf) (1)
1. Azeite virgem extra	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ou 75 mg/kg <Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg e (FAEE) (FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Azeite virgem	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Azeite lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (1)	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—
4. Azeite refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 se % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgins)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 se % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	—	—	—	> 350 (1)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Óleo de bagaço de azeitona	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Soma dos isómeros - separáveis ou não em coluna capilar.
(2) Ou quando a mediana dos defeitos for inferior ou igual a 3,5 e a mediana do frutado igual a 0.
(3) Os azeites cujo teor de caras esaja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de ácidos alifáticos totais for inferior ou igual a 390 mg/kg ou se a percentagem de entrodiole avoa for inferior ou igual a 3,5%.
(4) Os óleos cujo teor de caras esaja compreendido entre 300 mg/kg e 390 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de ácidos alifáticos totais for superior a 390 mg/kg e se a percentagem de entrodiole avoa for superior a 3,5%.

FIGURA 21. Características dos Azeites. Reg (UE) 61/2011 – Anexo I - 1ª parte 933

Categoria	Teor de ácidos (%)						Soma dos isómeros transoleicos (%)	Soma dos isómeros translinoleicos + translinoléicos (%)	Composição esterólica					Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodíol e uvaol (%) (*)	
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eico-senóico (%)	Beénico (%)	Lignocé-rico (%)			Colesterol (%)	Brassicas-terol (%)	Campesterol (%)	Estigmaste-rol (%)	Betasitos-terol (%) (†)			Delta-7-estigmas-tenol (%)
1. Azeite virgem extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Azeite virgem	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Azeite lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (*)
4. Azeite refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (*)
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

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

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

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

Notas:

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

FIGURA 22. Características dos Azeites. Reg (UE) 61/2011 – Anexo I - 2ª parte

1.8 PRINCIPAIS FACTORES NA CONSERVAÇÃO DO AZEITE

Uma vez produzido e classificado como azeite virgem extra, pelos parâmetros do regulamento (UE) 61/2011, o produto, cujo acrónimo internacional mais comum é EVOO (extra virgen olive oil), segue para distribuição e consumo, após embalagem. No Mediterrâneo, a embalagem tradicional do azeite é o vidro e, eventualmente para fins de exportação, a lata; nos últimos anos, introduziram-se também as embalagens de plástico e tetra brik[®]. A composição e as características destas embalagens são muito diferentes. A embalagem de vidro resulta da fusão de três principais componentes, sílica (~70%), carbonato de sódio (~14,5%) e carbonato de cálcio (9%), podendo ser incolor ou colorida pela adição de pequenas quantidades de manganês, cobalto, ferro, etc. A lata é composta por folha de flandres, um material laminado resultante da liga de ferro e aço de baixo teor de carbono revestido com estanho. As embalagens de plástico são constituídas por poli tereftalato de etileno (PET), podendo ser incolores ou coloridas e, em geral, são transparentes. A embalagem tetra brik, marca registada da tetra pak, consiste na combinação alternada de três materiais, polietileno, alumínio e papelão.

Em Portugal, segundo levantamento qualitativo realizado ao longo deste trabalho nos hipermercados da grande Lisboa, utilizam-se sobretudo embalagens de vidro; as embalagens plásticas são as seguintes mais frequentes, as de lata são bastante raras e não é do nosso conhecimento o uso da embalagem de tetra brik[®]. Em outros países, podem citar-se azeites em embalagens tetra brik[®] das marcas ArteOliva na Espanha, Venol na Grécia e Antica na Califórnia-Estados Unidos (ArteOliva, 2014; Venol, 2014; Antica, 2014).

Vários autores têm estudado o efeito do material da embalagem na conservação do azeite. Os resultados têm sido unânimes quanto ao PET, considerado inadequado para o armazenamento do azeite, uma vez que não actua como barreira para a oxidação e perda das suas qualidades sensoriais. As embalagens de vidro escuro, de lata e de tetra brik[®] são consideradas adequadas (Méndez & Falqué, 2007; Pristouri, Badeka & Kontominas, 2010; Samaniego-Sánchez, Oliveras-López, Quesada-Granados, Villalón-Mir & Serrana, 2012; Gargouri, Zribi & Bouaziz, 2014).

Quanto ao prazo de validade, o EVOO não tem uma regulamentação específica; o produto é considerado apto para o consumo enquanto apresentar as características de conformidade descritas no regulamento (UE) 61/2011.

À medida que o tempo passa, o azeite armazenado vai sofrendo transformações. Devido à quase inexistência de água, não ocorre o desenvolvimento de microorganismos; além disso, pelo processo de extracção, que remove a maior parte das proteínas, as reacções enzimáticas são quase inexpressivas, sendo porém de referir a acção da enzima lipoxigenase, que actua sobre os ácidos linoleico e linolénico levando à formação dos mono-hidroperóxidos correspondentes, os quais podem levar à cooxidação de compostos facilmente oxidáveis como os carotenóides e os polifenóis; o ácido oleico não é oxidado por esta enzima (Belitz, Grosch & Schieberle, 2004). Assim, as principais alterações verificadas no azeite armazenado são as resultantes das reacções químicas dos seus componentes, em geral as favorecidas pela luz, oxigénio e temperatura (Frankel, 2013).

Apesar da grande variedade de componentes com actividade antioxidante, que fornecem uma elevada resistência à deterioração oxidativa, e da sua composição maioritária em ácidos monoinsaturados, que são menos lábeis e reactivos que os ácidos polinsaturados, a mais importante causa de deterioração dos EVOO é a oxidação lipídica que promove, como principal consequência sensorial, a modificação do sabor original e o aparecimento de odores e gostos característicos do ranço, o qual representa para o consumidor, ou para o transformador industrial, um factor de depreciação ou rejeição (Bendini, Cerretani, Salvador, Fregapone & Lercker, 2010).

Dentre os processos de oxidação lipídica do azeite destacam-se a foto-oxidação e a auto-oxidação. Na foto-oxidação, os compostos minoritários capazes de absorver a luz, como a clorofila, passam para um estado excitado e, a seguir, transferem o excesso de energia para uma molécula de oxigénio no estado fundamental (oxigénio tripleto, $^3\text{O}_2$) dando origem ao oxigénio excitado (oxigénio singleto, $^1\text{O}_2$). O oxigénio singleto, por sua vez, é adicionado directamente a um carbono insaturado, por uma reacção de adição, formando um hidroperóxido. No caso dos ácidos gordos, a foto-oxidação resulta numa alteração da configuração da dupla ligação de *cis* para *trans*. Na figura 23 apresenta-se o mecanismo da foto-oxidação do ácido oleico. Por este mecanismo são

formados apenas 2 produtos e em quantidades iguais: ácido 9-hidroperoxi-*trans*-10-octadecenóico e ácido 10-hidroperoxi-*trans*-8-octadecenóico (Frankel, 1985).

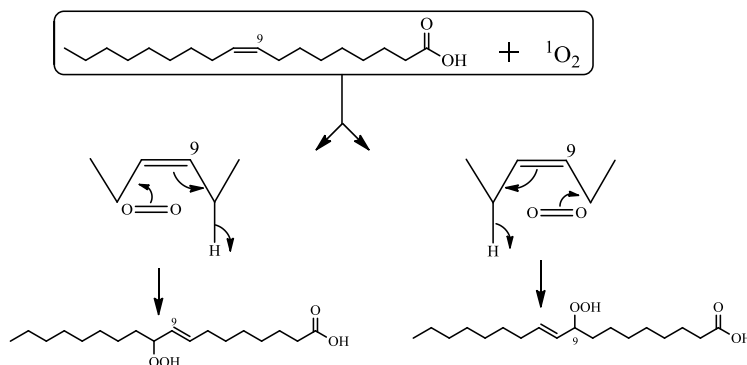


FIGURA 23. Mecanismo de adição da foto-oxidação (oxidação singleto) do ácido oleico, com formação de *trans*-hidroperóxidos (Frankel, 1985).

Segundo Frankel, Neff & Bessler (1979), a foto-oxidação pode ser 30.000 vezes mais rápida que a auto-oxidação. Contudo, eliminando-se a exposição do EVOO à luz, a maior parte da foto-oxidação durante o armazenamento pode ser evitada.

Em relação à auto-oxidação do azeite, a principal reacção envolve os seus ácidos gordos insaturados e ocorre em três etapas, iniciação, propagação e terminação, tal como a maior parte das reacções de radical livre. Na iniciação, forma-se um radical livre, pela saída de um hidrogénio do carbono adjacente à insaturação. Na propagação, os radicais livres são atacados pelo oxigénio no estado fundamental (oxigénio tripleto, $^3\text{O}_2$) e convertem-se em outros radicais de peróxidos e hidroperóxidos. Na terminação formam-se produtos estáveis, resultantes de cisão e rearranjo.

O mecanismo para a auto-oxidação do ácido oleico envolve a abstracção de um hidrogénio em C8 e em C11 produzindo dois radicais alílicos. O subsequente ataque do oxigénio produz quatro hidroperóxidos isómeros: 9-hidroxi-*trans*-10, 11-hidroxi-*cis*-9, 10-hidroperoxi-*trans*-8 e 8-hidroperoxi-*cis*-9-octadecenóico (Fig. 24) (Frankel, 1985).

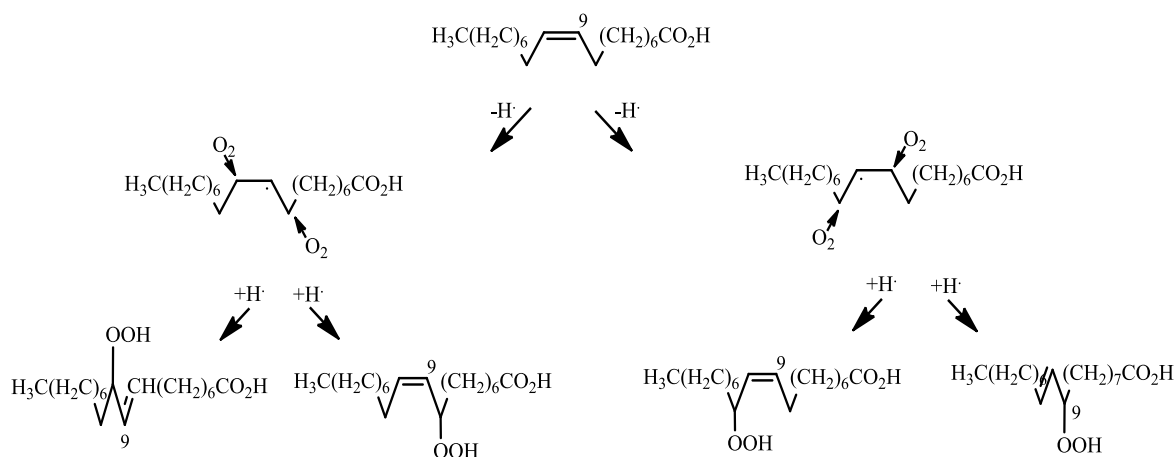


FIGURA 24. Mecanismo de auto-oxidação (oxidação tripleto) do ácido oleico, com formação de hidroperóxidos *cis* e *trans* (Frankel, 1985).

Como se viu pelos mecanismos de reacção do ácido oleico, o processo de formação dos hidroperóxidos pode ter lugar tanto pela foto-oxidação como pela auto-oxidação, é a chamada oxidação primária.

Os outros ácidos gordos insaturados do EVOO também oxidam-se segundo os mesmos mecanismos. No caso da auto-oxidação, a remoção do átomo de hidrogénio é mais fácil se o grupo α -metílico estiver situado entre duas ligações duplas, como acontece nos ácidos linoleico e linolénico.

O oxigénio tripleto reage sobretudo com os ácidos gordos insaturados na forma livre, mas também nas formas de gliceróis e fosfolípidos, e com alguns hidrocarbonetos, como o esqualeno e ainda com as vitaminas (A e E), os polifenóis e os pigmentos caratenóides.

A temperatura é um parâmetro importante no passo inicial da auto-oxidação, acelerando-a (Frankel, 1985).

Uma vez que os hidroperóxidos e os peróxidos são pouco estáveis, a oxidação pode prosseguir, também por mecanismo de radicais livres, dando origem a aldeídos, alcenos, álcoois, ácidos e diácidos: é a chamada oxidação secundária, como mostra a figura 25, em que LOOH representa todos os hidroperóxidos formados na oxidação primária. Também é designada de oxidação secundária a reacção dos peróxidos com as vitaminas (A e E) e os caratenóides (Jacobsen, 2013).

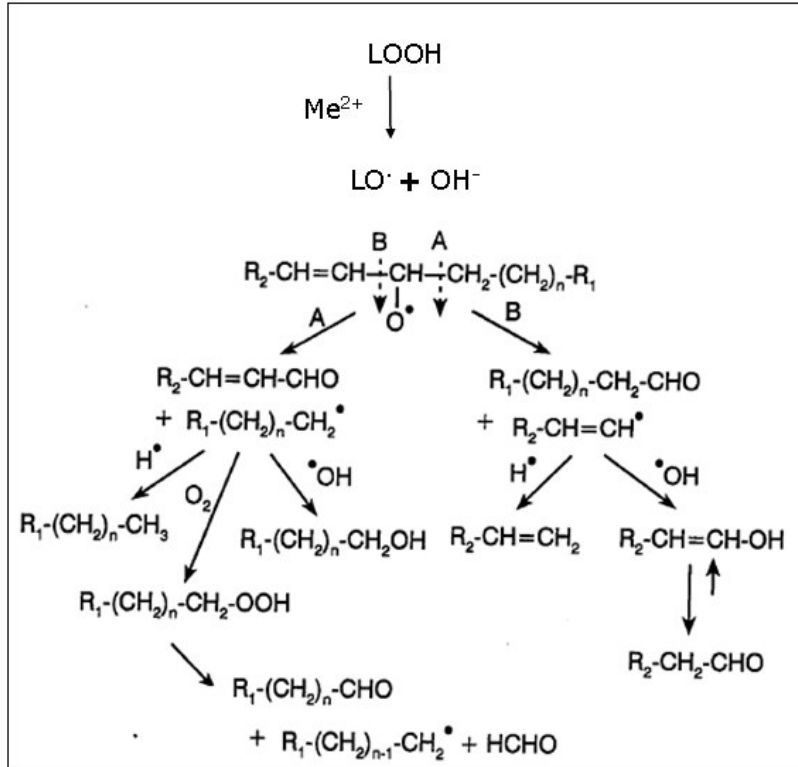


FIGURA 25. Oxidação secundária (adaptado de Jacobsen, 2013 e Frankel, 1998)

Alguns dos parâmetros químicos adoptados nas regulamentações oficiais para a avaliação da qualidade do azeite relacionam-se com a deterioração oxidativa, como o índice de peróxidos, para a oxidação primária, e os dienos e trienos conjugados, para a oxidação secundária (Regulamento UE 61, 2011).

Para além da determinação de dienos e trienos conjugados, a oxidação secundária pode ser monitorizada pela determinação de aldeídos, uma vez que são largamente considerados como responsáveis pelos maus odores em gorduras e óleos, devido aos seus baixos valores de limiar sensorial (Hudson, Gordon, Allen & Hamilton, 1994). Vários autores reportaram que o aquecimento do azeite a temperaturas na gama de 150°C a 180°C por períodos de tempo de 30 minutos a 12 horas promove um grande aumento no teor de aldeídos, revelado pelo índice de anisidina o qual evoluiu de 0,06 para 3,6 após 90 minutos a 180°C (Naz, Siddiqi, Sheikh & Sayeed, 2005) e de 6,8 para aproximadamente 90 após 12 horas a 180°C (Labrinea, Thomaidi, & Georgiou, 2001) (Fig. 26).

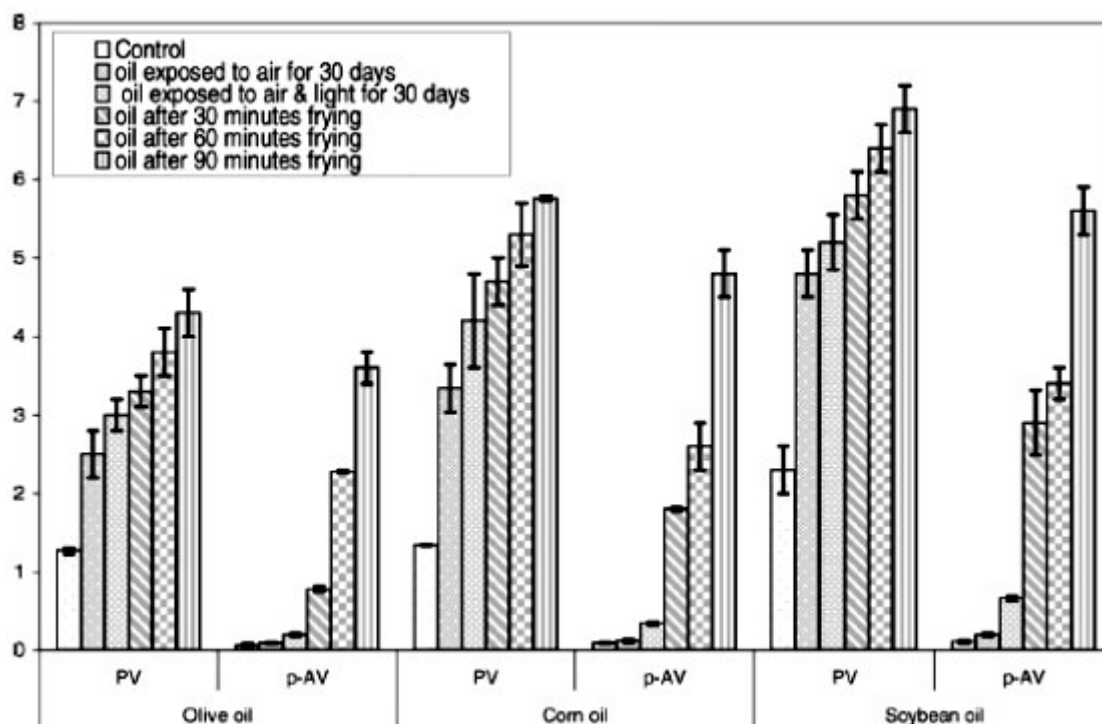


FIGURA 26. Efeito do ar, luz e temperatura de fritura, 180°C, no índice de peróxidos, PV, e no índice de anisidina, *p-AV*, em amostras de azeite, óleo de milho e óleo de soja (adaptado de Naz *et al*, 2005)

A medição integral da oxidação lipídica continua a ser um desafio, pela variedade e complexidade dos factores envolvidos. Uma larga gama de metodologias foi desenvolvida e implementada até o momento, para determinar os produtos de oxidação primária e secundária. A maioria dos métodos envolve procedimentos clássicos como titulações (por exemplo índice de peróxidos), absorção no visível (por exemplo teste do ácido tiobarbitúrico) e cromatografia (por exemplo malondialdeído e esteróis oxidados). Para além destas, também têm sido propostas metodologias mais recentes, como a quimioluminescência (para peróxidos), a emissão de fluorescência (para aldeídos e voláteis), a espectroscopia Raman (para peróxidos, insaturações e malondialdeído), a espectroscopia no infravermelho (para peróxidos, insaturações e malondialdeído) e a ressonância magnética nuclear (para peróxidos, aldeídos e dienos) (Barriuso, Astiasarán & Ansorena, 2013).

São conhecidos vários estudos sobre as alterações no azeite virgem extra como mostra a tabela 4.

TABELA 4. Estudos recentes sobre a estabilidade do azeite, em várias condições de armazenamento

TIPO DE AZEITE	VARIEDADE	CONDIÇÃO DE TEMPERATURA & TEMPO ESTUDADOS	PARÂMETROS ANALISADOS	CONCLUSÃO	REFERÊNCIAS
VIRGEM EXTRA	CORNICABRA	25 e 40°C/50 SEMANAS	IP, COMPOSTOS FENÓLICOS, TOCOFERÓIS, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS, RANCIMAT, K232, K270	AZEITES ARMAZENADOS COM 10% DE VOLUME LIVRE COM AR OU COM N2 APRESENTARAM MESMOS VARIAÇÕES DE IP E K232	MANCEBO-CAMPOS, SALVADOR & FREGAPANE, 2014
VIRGEM EXTRA	VARIÉDADES, ITALIANAS	-23°C E TAMB/18 MESES	IP, COMPOSTOS FENÓLICOS FENÓLICOS TOTAIS, IA, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS, PERFIL DE VOLÁTEIS	OS AZEITES CONGELADOS APRESENTARAM ALTERAÇÕES NEGLIGENCIÁVEIS O AZEITE DEVE SER ARMAZENADO A 14-15 °C E TEM UMA DURABILIDADE MÉDIA DE 1 ANO	MULINACCI, IERI, IGNESTI, ROMANI, MICHELOZZI, CRET... & CALAMAI, 2013 PISCOPO & POIANA, 2012
VIRGEM EXTRA	PICUAL	4°C E 20°C/9 MESES	IA, IP, K270, K232	A EMBALAGEM TETRA-BRIK É A MAIS ADEQUADA PARA ARMAZENAMENTO	SAMANIEGO-SÁNCHEZ, OLIVERAS-LÓPEZ, QUESADA-GRANADOS, VILLALÓN-MIR & SERRANA, 2012
MISTURA DE PRODUTOS DA AZEITONA COM OUTROS ÓLEOS	-	0-8°C/24 MESES	IA, IP, K232, CERAS	AS MISTURAS SÃO ESTÁVEIS POR ATÉ 24 MESES	BOSQUE-SENDRA, MATA-ESPINOSA, CUADROS-RODRÍGUEZ, GONZÁLEZ-CASADO, RODRÍGUEZ-GARCÍA & GARCÍA-TOLEDO, 2011
VIRGEM EXTRA	KORONEIKI	22°C/12 MESES	IA, IP, K270, K232	A EMBALAGEM EM VIDRO É A MAIS ADEQUADA PARA ARMAZENAMENTO, SEGUIDA DE PET	PRISTOURI, BADEKA & KONTOMINAS, 2010
VIRGEM EXTRA	CORNICABRA	25 A 60°C/ 93 A 19 SEMANAS	IP, COMPOSTOS FENÓLICOS, TOCOFERÓIS, RANCIMAT	OS VALORES DE K232 ATINGEM MAIS RAPIDAMENTE O VALOR MÁXIMO	MANCEBO-CAMPOS, FREGAPANE & SALVADOR, 2008
VIRGEM EXTRA	CORNICABRA	TAMBIENTE/21 MESES	IP, IA, K232, K270, IPÁ, COMPOSTOS FENÓLICOS, A-TOCOFEROL, RANCIMAT, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS, CLOROFILA E CAROTENÓIDES	OS VALORES DE IP, K232 E K270 AUMENTARAM LINEARMENTE DURANTE O ARMAZENAMENTO	GÓMEZ-ALONSO, MANCEBO-CAMPOS, SALVADOR & FREGAPANE, 2007
VIRGEM EXTRA	MISTURAS COMERCIAIS	20-22°C/3 e 6 MESES	IA, IP, K232, K270, COMPOSTOS FENÓLICOS, IID, ISAP	AS EMBALAGENS MAIS ADEQUADAS PARA ARMAZENAMENTO SÃO LATA E TETRA-BRIK	MÉNDEZ & FALQUÉ, 2007
AZEITE REFINADO	MISTURA COMERCIAL	180°C/30, 60 E 90 MIN	IP, IPÁ, IID	OS VALORES DE IP E IPÁ AUMENTAM RAPIDAMENTE COM O AUMENTO DA TEMPERATURA	NAZ ET AL, 2004 E 2005
VIRGEM EXTRA	ARBEQUINA	TAMBIENTE/12 MESES	CLOROFILA, TOCOFEROL, CAROTENÓIDES, COMPOSTOS FENÓLICOS, RANCIMAT, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	IMPORTANTES PERDAS DE CLOROFILA E CAROTENÓIDES, PERDA TOTAL DOS TOCOFEROIS	MORELLÓ, MOTILVA, TOVAR & ROMERO, 2004
VIRGEM EXTRA	MISTURA DE GALEGA COM OUTRAS VARIÉDADES	25°C/12 MESES	IA, IP, K232, K270, POLIFENOIS, RANCIMAT, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	SELECÇÃO DO LOTE GALEGA/COBRANÇOSA	PERES, HENRIQUES, SIMÕES-LOPES & PINHEIRO-ALVES, 2003
VIRGEM EXTRA	PICUAL E HOJIBLANCA	2°C E 30°C/6 MESES	ÍNDICE DE PERÓXIDOS, IP, IA, K270, POLIFENOIS, TOCOFERÓIS, ESTEROIS, CLOROFILA, PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS, AVALIAÇÃO SENSORIAL	OS VALORES DE K270 ATINGEM MAIS RAPIDAMENTE O VALOR MÁXIMO, JUNTAMENTE COM A AVALIAÇÃO SENSORIAL	GUTIÉRREZ & FERNÁNDEZ, 2002

1.9 ESTRATÉGIA ADOPTADA NO TRABALHO

Como se pode ver na tabela 4, nos artigos sobre a estabilidade do azeite virgem extra, apenas o estudo de Peres, Henriques, Simões-Lopes & Pinheiro-Alves (2003) referiu variedades portuguesas, sendo que não se estudaram azeites monovarietais e testou-se somente uma condição de armazenamento, nomeadamente a 25°C em frasco âmbar.

No presente trabalho, o objectivo foi avaliar o estado de conservação de azeites virgem extra, de acordo com o armazenamento, num contexto possível de ser utilizado pelo consumidor em Portugal. Assim, seleccionaram-se quatro condições de armazenamento, a saber: (1) à temperatura controlada a 4°C, em frasco âmbar e no escuro (4°C); (2) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco âmbar e sob luz artificial (FELA); (3) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco incolor e sob luz artificial (FILA); (4) à temperatura ambiente não controlada, em frasco incolor e sob luz natural (FILN), nas quais as amostras de azeite foram armazenadas durante 12 meses.

A selecção das amostras para o trabalho fez-se tendo em consideração a diversidade geográfica de Portugal e as regiões de maior produção de azeite, que são o Alentejo e Trás-os Montes (Fig. 31). Os nomes dos fornecedores e as datas das recolhas constam na tabela 5.

Conforme já referido no tópico 1.8, a mais importante causa de deterioração dos EVOO é a oxidação lipídica que, nos casos da auto-oxidação e da oxidação secundária, ocorre com a formação de radicais livres, os quais podem reagir directamente com uma biomolécula originando lesões bioquímicas (Lobo, Patil, Phatak & Chandra, 2010). A regulamentação em vigor utiliza o índice de peróxidos no controlo da oxidação, sendo 20 meq O₂/kg o valor máximo (Regulamento UE nº 61/2011). Por incluir conjuntamente a oxidação secundária, vários autores recomendam que a regulamentação da oxidação incorpore o parâmetro TOTOX, o qual corresponde à soma do índice de anisidina com o índice de peróxidos- previamente multiplicado por dois. (Caponio, Chiavaro, Paradiso, Paciulli, Summo, Cerretani & Gomes, 2013). Além destes parâmetros, também os pigmentos derivados da clorofila são reconhecidos como indicadores da qualidade dos óleos, sendo a sua determinação quantitativa padronizada pela IUPAC (1995) e AOCS (1997), para todos os óleos vegetais em bruto.

Tendo em conta o exposto, considerou-se que o estado de conservação dos azeites poderia ser acompanhado a partir de 3 parâmetros principais, nomeadamente o índice de peróxidos, IP, o índice de *p*-anisidina, IpA, e o teor de clorofila. Para além destes, adoptou-se determinar outros parâmetros do azeite, nomeadamente o índice de iodo, IId, os tocoferóis totais, TT, e o índice de acidez, IA, como parâmetros auxiliares, com vista a melhor caracterizar os azeites em estudo.

Por forma a aferir os resultados principais, seleccionaram-se amostras representativas do estudo e realizaram-se as suas determinações de índice de peróxidos tanto na Cooperativa Egas Moniz como no Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, INSA, sincronizadamente. Os pormenores deste procedimento constam no tópico 2.3.1, os resultados respectivos estão apresentados na tabela 12.

A seguir apresenta-se uma rápida revisão sobre os princípios teóricos dos ensaios seleccionados e realizados. A calendarização e os métodos analíticos respectivos constam no tópico 2.2.

Índice de peróxidos, IP

Trata-se de uma titulação redox em que o indicador é o complexo amido-iodo. Inicialmente, o peróxido/hidroperóxido da amostra converte estequiometricamente o KI em excesso a I_3^- . A seguir, o I_3^- complexa reversivelmente com o amido, por incorporação de I_2 na hélice da amilose, formando um complexo azul. A adição do S_2O_3 no erlenmeyer, a partir da bureta, vai consumindo estequiometricamente o I_3^- , e regenerando o I^- , pela formação do S_4O_6 . Quando todo o I_3^- é consumido a solução volta a ficar incolor, indicando o ponto final da titulação. A quantificação é indirecta, considera-se que todo o peróxido presente na amostra levou à formação do $S_4O_6^{2-}$ e relaciona-se com o volume gasto de titulante. O I_3^- é o intermediário formado e consumido durante este processo (Fig. 27).

1º Passo, reacção do peróxido/hidroperóxido da amostra com excesso de iodeto:



2º Passo, formação do complexo corado (reacção reversível):



3º Passo, titulação com tiosulfato:

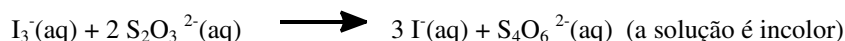


FIGURA 27. Reacções envolvidas na determinação do índice de peróxidos.

Índice de anisidina, IpA

Fundamenta-se na reacção das aminas com os aldeídos formando iminas. Aqui, a reacção da *p*-anisidina com os aldeídos do azeite forma um composto corado com absorção em 350 nm. A figura 28 mostra um exemplo para a reacção com o (*E*)-hex-2-enal. Devido ao teor de aldeídos naturais do aroma e de outras funções da planta, utiliza-se o índice de anisidina como um valor comparativo de uma mesma amostra em várias situações.

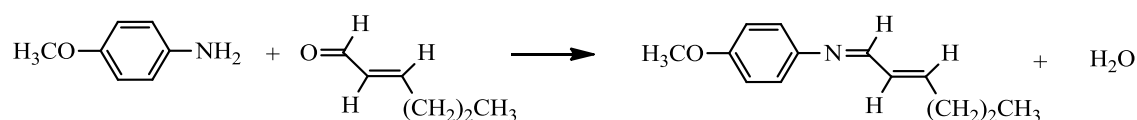


FIGURA 28. Reacção envolvida na determinação do índice de anisidina.

Teor de clorofila, C

A clorofila converte-se maioritariamente em feofitina durante o processamento da azeitona. A conversão geralmente está completa após 1 mês de armazenamento (Giuliani, Cerretani & Cichelli, 2011) (Fig 29).

O método espectrofotométrico baseia-se na leitura da absorvência em 671 ± 1 nm, correspondente ao λ_{max} de absorção da feofitina a, sendo o ruído da linha de base devidamente corrigido pela subtracção das absorvências em 630 nm e 710 nm.

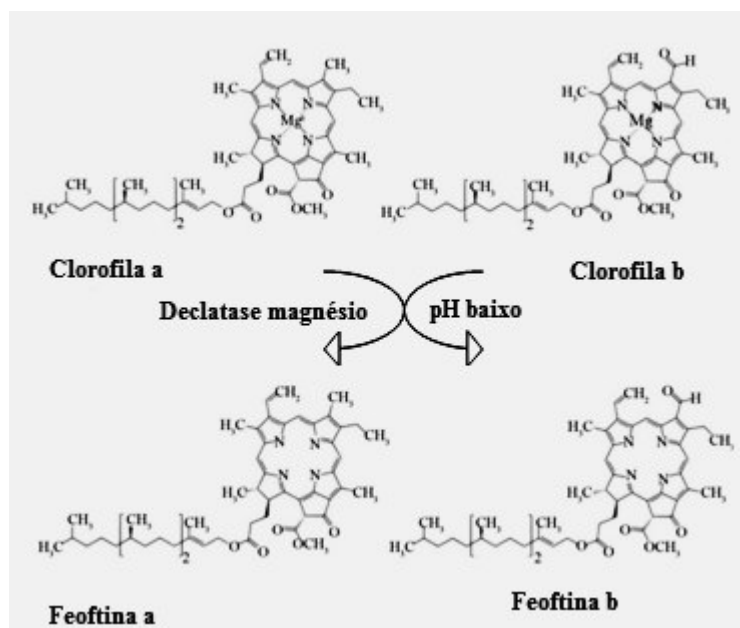


FIGURA 29. Conversão das clorofilas a e b nas feofitinas respectivas (Adaptado de Hsu, Chao, Hu & Yang, 2013).

Índice de iodo, IId

Um volume conhecido de concentração conhecida do reagente de Wijis (ICl) é adicionado ao azeite. Parte do cloreto de iodo reage com os ácidos gordos insaturados sendo adicionado às ligações duplas, formando o derivado halogenado. A fracção de cloreto de iodo não consumida na reacção é convertida ao ião I_3^- e titulada com tiosulfato, usando amido como indicador, tal como já apresentado no 2º e 3º passos da reacção do índice de peróxidos. As insaturações carbono-carbono presentes no azeite correspondem à subtracção entre o ICl inicial e o ICl titulado. A figura 30 mostra a adição do reagente Wijis ao ácido oleico presente num triacilglicerol.

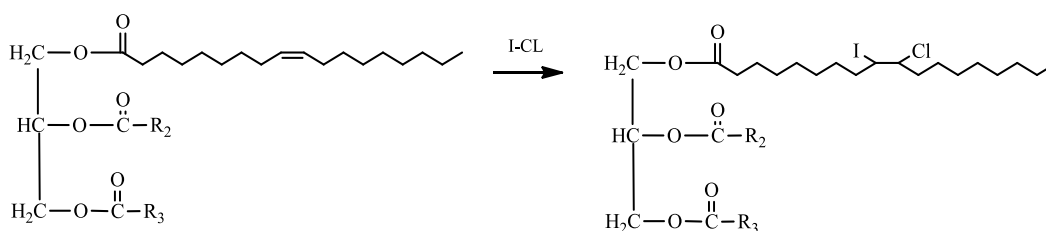


FIGURA 30. Reacção de adição à insaturação, envolvida na determinação do índice de iodo.

Tocoferóis totais, TT

Na reacção desenvolvida por Emmerie-Engel, os tocoferóis reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} o qual complexa a seguir com a 2,2'-bipiridina formando um complexo corado com absorção em 530 nm (Fig. 31).

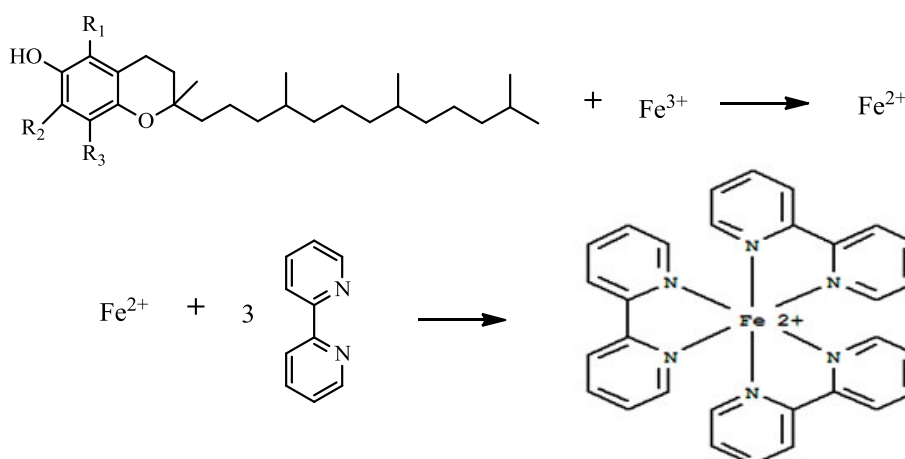


Figura 31. Reacção de Emmerie-Engel, determinação dos tocoferóis totais, em que α tocoferol: $R_1=H$, $R_2=CH_3$; $R_3=CH_3$; β tocoferol: $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3$; $R_3=H$; γ tocoferol: $R_1=H$, $R_2=CH_3$, $R_3=CH_3$.

Índice de acidez, IA

Os ácidos livres, resultantes da hidrólise ocorrida nos triacilglicerois do azeite, são determinados numa titulação ácido-base, usando fenolftaleína como indicador, na presença de mistura dissolvente éter/etanol, em que o titulante é o hidróxido de sódio aquoso. Quando o NaOH cai da bureta no erlenmeyer, a fase aquosa básica torna-se rosa, pela acção da fenolftaleína. Devido à presença de uma fase aquosa básica, o ácido gordo, que está livre na fase orgânica, é extraído para ela, neutralizando o efeito da base, e a fase aquosa passa a incolor. O processo vai se repetindo até não haver mais ácido livre: neste momento a fase aquosa permanece rosa, mesmo depois de agitação intensa (Fig. 32).

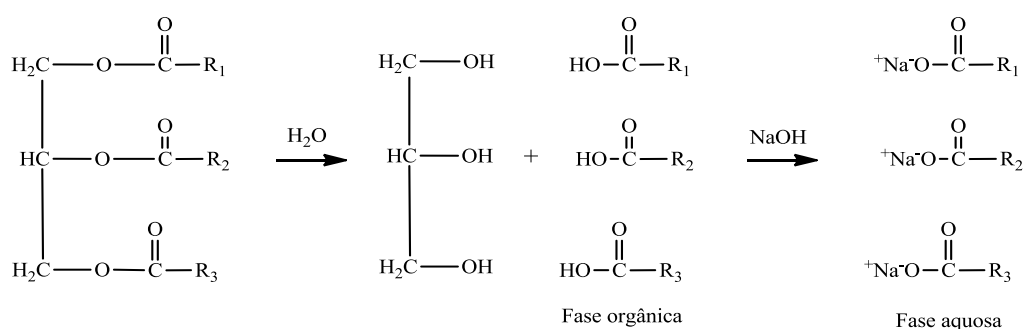


FIGURA 32. Reacção envolvida na determinação do índice de acidez.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A água utilizada em todas as determinações efectuadas foi obtida do equipamento Elix – Millipore com uma condutividade menor que $1\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20°C , classificada como água de grau analítico (água tipo II na classificação ASTM), pelo que, qualquer a menção à «água» no procedimento deve ser entendida como «água de grau analítico».

2.1 SELECÇÃO, RECOLHA, EMBALAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de azeite foram seleccionadas segundo a distribuição geográfica indicada na figura 33. Após a assinatura do protocolo de colaboração entre os produtores e a Cooperativa Egas Moniz de Ensino Superior, apresentado no anexo A, as amostras foram recolhidas directamente nos locais de produção, entre Novembro de 2012 e Janeiro de 2013, a seguir à última centrifugação da produção e antes da última filtração, que costuma executar-se aquando do engarrafamento do azeite comercial. A recolha foi feita em garrafão de plástico, sendo o volume de aproximadamente 3 litros de azeite. O referido procedimento realizou-se por 3 vezes, indicadas na tabela 5. Em geral, a primeira recolha ocorreu quando os fornecedores começaram a laborar (início da campanha), a segunda a meio da laboração (meio da campanha) e a última no fim da laboração (fim da campanha).

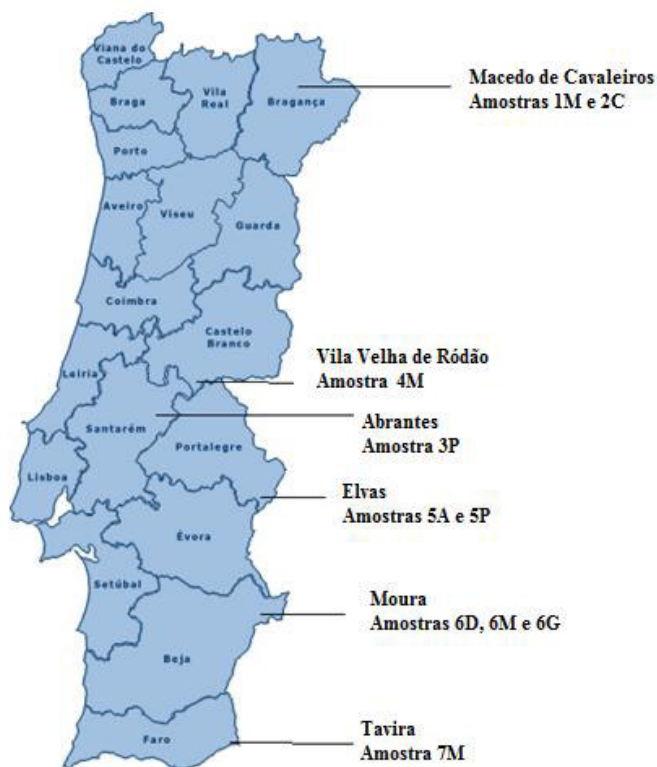


FIGURA 33. Localização geográfica dos locais de colheita das amostras de azeite

TABELA 5. Lista dos fornecedores, variedades da azeitona de cada amostra, identificação da amostra e datas da colheita

Região:	Variedade da azeitona	Identificação da amostra	Data da colheita	
Trás-os-Montes e Alto Douro	Mistura	1M	1M1	01/12/2012
			1M2	03/12/2012
			1M3	10/12/2012
	Cobrançosa	2C	2C1	30/11/2012
			2C2	03/12/2012
			2C3	4/12/2012
Ribatejo	Picual	3P	3P1	24/11/2012
			3P2	01/12/2012
			3P3	15/12/2012
Beira Baixa	Mistura	4M	4M1	24/11/2012
			4M2	03/12/2012
			4M3	17/12/2012
Alto Alentejo	Arbequina	5A	5A1	22/11/2012
			5A2	09/12/2012
			5A3	17/12/2012
	Picual	5P	5P1	22/11/2012
			5P2	09/12/2012
			5P3	17/12/2012
Baixo Alentejo	DOP	6D	6D1	21/11/2012
			6D2	06/12/2012
			6D3	12/01/2013
	Mistura	6M	6M1	21/11/2012
			6M2	06/12/2012
			6M3	12/01/2013
	Galega	6G	6G1	21/11/2012
			6G2	06/12/2012
			6G3	12/01/2013
Algarve	Mistura	7M	7M1	17/11/2012
			7M2	18/11/2012
			7M3	13/01/2013

No laboratório, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro - âmbar de 100 mL, incolor de 750 mL ou âmbar de 1000 mL, consoante o tipo de armazenamento - adquiridos ao Depósito da Marinha Grande (DMG, 2014), previamente lavados com água e secados a 60°C por 2 dias. Os frascos âmbar possuíam tampas de plástico com vedação tipo lacre. Nos frascos incolores a tampa era rolha de cortiça, pelo que, para

garantir a vedação, envolveu-se a parte exterior do conjunto garrafa/rolha com parafilm®.

Aquando da distribuição das amostras pelos frascos correspondentes a cada armazenamento, verificou-se que algumas amostras apresentavam um depósito e supôs-se que poderia ser necessário uma etapa de preparação das amostras. Para isso foi testado um procedimento de centrifugação, em tubos de 50 mL, a 500 rpm por 15 minutos a 10°C, após o qual as amostras apresentaram apenas um ligeiro sedimento. Por outro lado, verificou-se que a transferência do garrafão de plástico para os frascos de vidro, uma vez efectuada num pequeno caudal e sem turbulência, poderia ser realizada sem arrastar o depósito, que era constituído por películas e pequenas massas de azeitona. Assim, descartou-se a centrifugação e adoptou-se a transferência directa.

Após a transferência do azeite, as amostras foram armazenadas nas instalações da Cooperativa Egas Moniz em 4 condições, nomeadamente: (1) à temperatura controlada a 4°C, em frasco âmbar e no escuro (4°C); (2) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco âmbar e sob luz artificial (FELA); (3) à temperatura controlada 22-26°C, em frasco incolor e sob luz artificial (FILA); (4) à temperatura ambiente não controlada, em frasco incolor e sob luz natural (FILN), nas quais as amostras de azeite foram armazenadas durante 12 meses.

A condição de armazenamento condicionou o volume do frasco utilizado e o modo de obtenção das alíquotas para os ensaios analíticos. Na condição a 4°C, as amostras foram subdivididas em frascos de vidro âmbar de 100 mL, para que, aquando dos ensaios, não se retirasse a amostra total da condição de armazenamento mas apenas a alíquota necessária (Fig. 34-A). Na condição FELA, os frascos tinham volume de 1000 mL e as alíquotas para todos os ensaios ao longo do ano foram retiradas do mesmo frasco. O mesmo ocorreu com as amostras FILA e FILN, excepto que o volume dos frascos era de 750 mL.

Nas condições FELA e FILA, a luz artificial aplicada resultou de 8 lâmpadas de mercúrio com 1,25 cd/cm² (ref Philips TLD 36W/840) existentes num laboratório de 40 m². Esta iluminância está conforme o intervalo de 500 a 1000 lux recomendada pela EN 12464-1:2011 para supermercados (Fig. 34-B e C).

Na condição FILN as amostras estiveram um armário de vidro forrado com papel de filtro branco, num corredor exposto à luz natural (Fig. 34-D). No período estudado, a luz natural da região de Lisboa correspondeu à luminância média de 7000 lux. As medições periódicas de temperatura, realizadas em geral às 16h do dia, indicaram que a gama de temperaturas ao longo de 12 meses foi de 7°C a 40°C, sendo 15°C-18°C o intervalo mais frequente, verificado em cerca de 60% das medições.

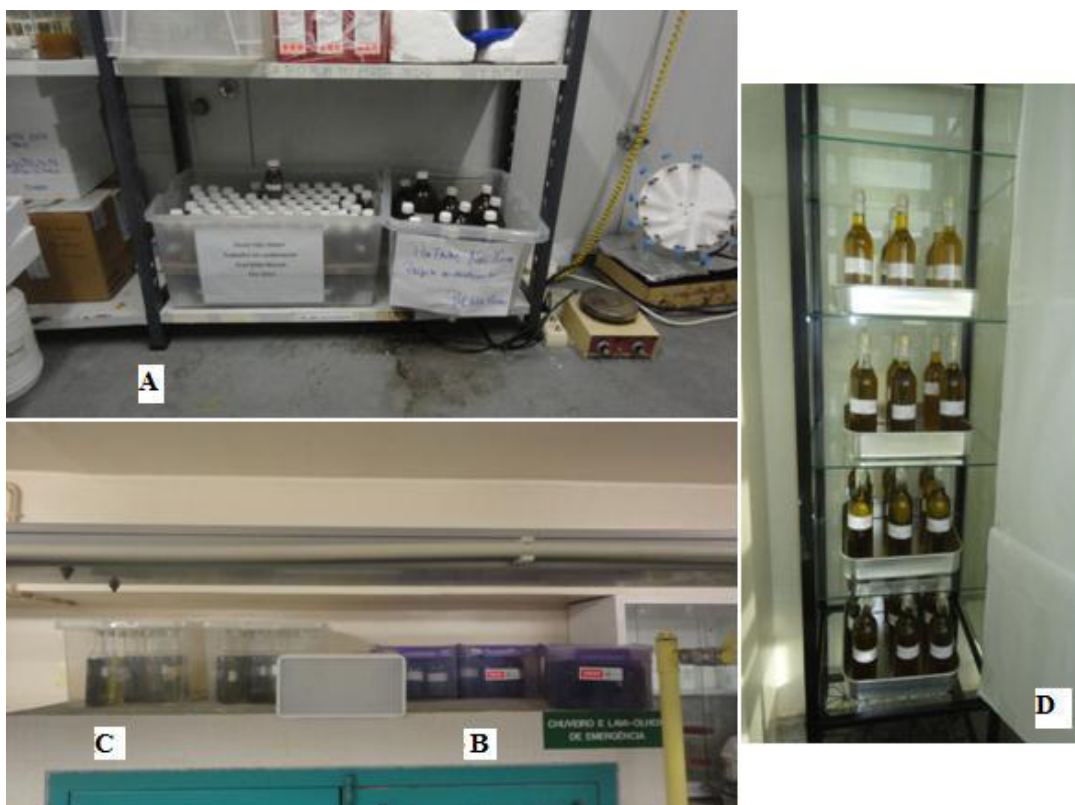


FIGURA 34. Condições de armazenamento das amostras: (A) a 4°C, (B) FELA, (C) FILA, (D) FILN, instalações da Coop Egas Moniz (foto Z Morais, 2013).

2.2. MÉTODOS UTILIZADOS E PERIODICIDADE DOS ENSAIOS

A tabela 6 apresenta as referências dos métodos e a frequência de análise dos parâmetros estudados.

TABELA 6. Referências dos procedimentos analíticos e sua periodicidade

Parâmetro	Procedimento	Periodicidade
Índice de Peróxidos, IP	NP-904:1987	Bimestral, a partir da produção
Índice de Anisidina, IpA	ISO 6885:2006	Bimestral, a partir da produção
Teor de Clorofila, C	AOCS Ch 4-91	Bimestral, a partir da produção
Índice de Iodo, IId	AOAC 993.20	6 e 10 meses após o armazenamento

Tocoferóis Totais, TT	Wong, Timms & Goh, 1988	10 meses após o armazenamento
Índice de Acidez, IA	NP 903-1987	12 meses após o armazenamento.

2.3. PARÂMETROS PRINCIPAIS

Os resultados experimentais obtidos, para o índice de peróxidos, índice de anisidina e clorofila foram realizados nas datas indicadas na tabela 7.

TABELA 7. Data de realização das determinações de Índice de Peróxidos, Índice de Anisidina e Clorofila, e tempo decorrido após a colheita

Determinação	Índice de Peróxidos	Índice de Anisidina	Clorofila	Tempo decorrido após a colheita
1 ^a	09-02-2013	23-03-2013	15-02-2013	2 meses
2 ^a	21-04-2013	20-04-2013	18-04-2013	4 meses
3 ^a	20-07-2013	19-07-2013	30-06-2013	6 meses
4 ^a	30-08-2013	06-09-2013	23-08-2013	8 meses
5 ^a	25-10-2013	07-11-2013	26-10-2013	10 meses
6 ^a	25-01-2014	24-01-2014	25-01-2014	12 meses

2.3.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS, IP

O índice de peróxidos foi realizado segundo a norma NP-904:1987.

Pesou-se com aproximação ao décimo de miligrama, para um erlenmeyer de 200 mL com tampa esmerilhada, uma toma de amostra com massa da ordem indicada na tabela 8.

TABELA 8. Indicação da toma de ensaio para a determinação do índice de peróxidos

Índice de peróxido presumível (meq O ₂ /kg)	Toma para o ensaio (g)
0 a 19	2,0 a 1,2
>19 a 31	1,2 a 0,8
>31 a 50	0,8 a 0,5
>50	0,5 a 0,3

Dissolveu-se a toma de amostra em 10 mL de clorofórmio (Carlos Erba ref 438601) e adicionou-se 15 mL de ácido acético glacial (Carlo Erba ref 401422), estes solventes foram medidos por proveta.

Adicionou-se 1 mL de solução saturada de iodeto do potássio (Scharlau ref PO0410100), medido por pipeta graduada. De seguida, fechou-se imediatamente o erlenmeyer, agitou-se durante 1 minuto e aguardou-se 5 minutos ao abrigo da luz.

Adicionou-se, logo de seguida, 75 mL de água e titulou-se com tiosulfato de sódio* 0,01 mol/dm³, a partir de uma bureta de 25 mL, usando 2 mL de solução de amido** como indicador, até à mudança de cor (azul → transparente/branca).

Preparou-se, em paralelo com as amostras, um branco sem a presença de amostra.

O índice de peróxidos, IP, em meq O₂/kg, é dado por:

$$IP = \frac{[(v1 - v2) \times N \times 1000]}{m}$$

Sendo: *v1* – volume, em mL, da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra; *v2*- volume, em mL, da solução tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco; *m*- massa, em gramas, da toma de amostra; *N*- concentração da solução de tiosulfato de sódio.

Os resultados apresentam-se arredondados às unidades.

O cálculo do TOTOX está apresentado no final do tópico 2.3.2

* Tiosulfato de sódio (Sigma Aldrich ref 72049), 0,01N = 0,01 mol/dm³: dissolveu-se 2,6g de tiosulfato de sódio em 1 litro de água.

** Solução de amido: levou-se até à ebulição 1g de amido dissolvido em 100mL de água.

Nota: seleccionaram-se 4 amostras e realizaram-se as suas determinações de índice de peróxidos tanto na Cooperativa Egas Moniz como no Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, sincronizadamente, no dia 25 de Outubro de 2013. As amostras seleccionadas foram 5A1 - condição FILN; 6G2 – condição FILN; 5A1 – condição FELA e 6G2 – condição FELA, codificadas respectivamente como A, B, C, D, no envio. Os resultados estão apresentados na tabela 12.

2.3.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ANISIDINA, IPA

A determinação seguiu a norma ISO 6885:2006.

Pesou-se 0,76-0,9 g de amostra, com aproximação à miligrama, directamente para um balão volumétrico de 25 mL, dissolveu-se com 5 mL de diclorometano (Carlo Erba ref 463001) e completou-se o volume à marca: solução amostra.

Transferiu-se 5 mL da solução amostra para um tubo de ensaio com tampa e adicionou-se 1 mL de ácido acético (Carlo Erba ref 401422). Agitou-se bem e guardou-se ao abrigo da luz durante 8 minutos a 23 ± 3 °C. – Não Reacção

Transferiu-se 5 mL da solução amostra para um tubo de ensaio com tampa e adicionou-se 1 mL de solução de *p*-anisidina*. Agitou-se bem e guardou-se ao abrigo da luz durante 8 minutos a 23 ± 3 °C. - Reacção

Preparou-se em paralelo um branco com 5 mL de diclorometano e 1 mL de solução de anisidina. Agitou-se bem e guardou-se ao abrigo da luz durante 8 minutos a 23 ± 3 °C.

Procedeu-se de imediato às leituras de absorvância a λ 350 nm, em células de quartzo, no espectrofotómetro Perkin Elmer - Lambda 25.

O índice de anisidina, IpA, adimensional, é dado por:

$$IpA = \frac{100 \times Q \times V}{m} [1,2 \times (A_1 - A_2 - A_0)]$$

Sendo: v- volume no qual a amostra é dissolvida ($v = 25$ mL); m- massa da amostra em grama; Q- factor de conversão para grama por mililitro (0,01); A_0 – absorvância da Não reacção; A_1 - absorvância da reacção; A_2 - absorvância do branco; 1,2 – factor de correcção para a diluição da amostra com 1 mL do ácido acético glacial.

Os resultados apresentam-se arredondados à décima.

*Solução de anisidina: dissolveram-se 0,125g de *p*-anisidina (Alfa Aesar ref A10946) em ácido acético glacial num balão volumétrico de 50 mL.

O valor de TOTOX, adimensional, é dado por: $(2 \times IP) + IpA$

Sendo: IP - índice de peróxidos, em meq O_2 /Kg; IpA – índice de anisidina, adimensional.

Os resultados apresentam-se arredondados à unidade.

2.3.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA, C

A determinação da clorofila baseou-se no método da AOCS Ch 4-91.

Procedeu-se à leitura das absorvâncias da amostra de azeite tal e qual, inserida em célula de plástico com 1 cm de percurso óptico, nos comprimentos de onda 630, 671 e 710 nm (Perkin Elmer- Lambda 25), utilizando ar na referência.

O teor de clorofila, em mg/kg ou ppm, é dado por:

$$C = \frac{A_{671} - [(A_{630} + A_{710}) \div 2]}{0,0964 \times L}$$

Sendo: A-absorvância; L- percurso óptico.

Os resultados apresentam-se arredondados às centésimas.

2.4. PARÂMETROS AUXILIARES

2.4.1. DETERMINAÇÃO ÍNDICE DE IODO, IId

O índice de iodo foi determinado pelo método AOAC 993.20, tendo-se utilizado o reagente de Wijs.

Pesou-se para um erlenmeyer de 500 mL uma massa de azeite entre 0,32-0,40 g, com aproximação à décima de miligrama, e diluiu-se com 15 mL da mistura de solventes (ciclo-hexano Carlo Erba ref 528215): ácido acético (Carlo Erba ref 401422), 1:1). De seguida, juntou-se 25 mL de reagente de Wijs (Panreac ref 281590.1611) e agitou-se bem de forma a uniformizar a solução.

Aguardou-se 60 minutos ao abrigo da luz. A seguir retirou-se o erlenmeyer do escuro e adicionou-se 20 mL de iodeto de potássio* seguidos de 150 mL de água e titulou-se com tiosulfato de sódio 0,1 mol/dm³ ** a partir de uma bureta de 20 mL, usando 1 mL de solução de amido*** como indicador, até à mudança de cor (azul → transparente/branca).

Preparou-se, em paralelo com as amostras, um branco, sem a presença de amostra.

O índice de iodo, IId, adimensional, é dado por:

$$IId = \frac{12,69 \times C \times (V_1 - V_2)}{m}$$

Sendo: C- concentração exacta, expressa em mol/L, da solução titulada de tiosulfato de sódio utilizada; V₁ – volume, em mL, da solução titulada de tiosulfato de sódio gasto

no ensaio em branco; V_2 – volume, em mL, da solução titulada de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra; m- massa da toma de amostra em grama.

Os resultados apresentam-se arredondados às unidades.

* Iodeto de potássio (Scharlau ref PO0410100): dissolveu-se 15 g de iodeto de potássio em 100 mL de água.

** Tiosulfato de sódio (Sigma Aldrich ref 72049), 0,1N = 0,1 mol/dm³: pesou-se 7,906 g de tiosulfato de sódio e dissolveu-se para um volume final de 500 mL.

*** Solução de amido: levou-se até à ebulição 1g de amido dissolvido em 100 mL de água.

2.4.2. DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS TOTAIS, TT

A determinação de tocoferóis seguiu a reacção de Emmerie-Engel no procedimento descrito por Wong, Timms & Goh (1988), excepto que não se procedeu à remoção dos carotenóides, por pré-tratamento da amostra a 250°C, pelo que os resultados são comparativos intra-amostra. A absorvância foi lida a 520 nm no espectrofotómetro Perkin Elmer - Lambda 25.

Pesou-se para um balão volumétrico de 10 mL, 0,2 g de amostra de azeite, de seguida adicionou-se 5 mL de tolueno (Carlo Erba, ref 488551), 3,5 mL de solução de biperidina* e 0,5 mL de solução de cloreto de ferro**. Após a adição dos reagentes completou-se o volume do balão com etanol a 95% (Aga, ref UN 1170). Aguardou-se 1 minuto ao abrigo da luz e efectuou-se a leitura de absorvância a $\lambda = 520$ nm, contra um branco. As medidas realizaram-se contra uma curva de calibração com 20; 13; 8 e 4 mg/L de tocoferol (Sigma Aldrich ref T3251-5G).

*Solução de biperidina (Alfa Aesar ref A157882): pesou-se 0,07 g de 2,2-biperidina e dissolveu-se em 100 mL de etanol 95%.

** Solução de cloreto de ferro (Chem-Lab ref CL00.0910.0500): 0,2 g de cloreto de ferro e dissolveu-se em 100 mL de etanol 95%.

2.4.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ, IA

A determinação do índice de acidez foi realizada segundo a norma NP 903-1987.

Pesou-se para um erlenmeyer, com aproximação ao miligrama, uma toma homogeneizada de 20 g de azeite, segundo a tabela 9. Dissolveu-se esta toma em 50 mL de dissolvente (éter etílico (Panreac, ref 21270.0311): etanol 1:1). Agitou-se e adicionou-se algumas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína*. De seguida procedeu-se à titulação com solução de hidróxido de sódio** até aparecimento de cor

rosada. Preparou-se, em paralelo com as amostras, um branco sem a presença de amostra.

TABELA 9. Indicação da toma de ensaio para a determinação do índice de acidez

Índice de acidez presumível	Toma para o ensaio(g)
< 1	20
1 a 4	10
> 4 a 15	2,5
> 15	0,5

O índice de acidez, IA, expresso em g/100g ácido oleico, é dado por:

$$IA = \frac{2,82 \times (v - v_0)}{m}$$

Onde: m= massa, em gramas, da toma de azeite; v = volume, em mL, da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/dm³ gasto na titulação da amostra; v₀= volume, em mL, da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/dm³ gasto na titulação do branco.

Os resultados são apresentados arredondados à décima.

* Solução alcoólica de fenolftaleína (Merck, ref 7233.0100): pesou-se 2g de fenolftaleína e dissolveu-se em 100 mL de álcool etílico.

** Hidróxido de sódio (EKA Chemicals, ref 30014) 0,01 N = 0,1 mol/dm³: pesou-se 4g de hidróxido de sódio e dissolveu-se para 1000 mL de água, em balão volumétrico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na apresentação dos resultados optou-se por primeiramente referir os resultados de cada amostra, nas condições estudadas, e a seguir mostrar os resultados compilados das várias amostras por cada parâmetro estudado, nomeadamente índice de peróxidos, IP, o índice de *p*-anisidina, IpA, teor de clorofila, índice de iodo, IId, os tocoferóis totais, TT, e o índice de acidez, IA, nas condições de armazenamento seleccionadas, designadamente 4°C, FELA, FILA e FILN. No tópico 3.3 apresenta-se um resumo de todos os resultados.

3.1. RESULTADOS POR AMOSTRA

3.1.1. AMOSTRA 1M

As amostras, apresentando cor característica do azeite com tons amarelados, foram colhidas na Região de Trás-os-Monte e Alto Douro, em 3 etapas da safra 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra resulta de uma mistura de variedades de azeitona onde predominam as variedades Cobrançosa, Verdeal, e Cordovil. Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de peróxidos, anisidina, e teor de clorofila, o qual revelou ser o maior de todas as amostras em estudo: 12,43 mg/kg, após 2 meses de armazenamento, a 4°C, valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez, após 12 meses de armazenamento, a 4°C foi de 0,2 g/100g de ácido oleico e na condição FILN foi de 0,3 g/100g de ácido oleico. Para a anisidina obteve-se um valor médio de $12,4 \pm 2,3$ para $n=72$, nas quatro condições de armazenamento em estudo. Já o índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 35, tendo passado de 2, após 2 meses na condição 4°C, para 19, após 12 meses na condição FILA.

Uma vez que se encontraram valores permanentemente crescentes de peróxidos em relação ao tempo, procurou-se uma relação matemática entre as duas grandezas. As equações apresentadas na legenda da figura 35 mostram os parâmetros para uma regressão linear, obtidos pela introdução do tempo decorrido em meses, como variável independente, e o correspondente valor de índice de peróxidos, como variável dependente, em cada uma das quatro condições de armazenamento, tendo-se adoptado $IP_0 = \frac{1}{2} IP_2$.

Os valores de R^2 correspondem ao coeficiente de correlação de Pearson, em cada caso. A utilidade destas equações, nos casos em que o coeficiente de correlação é superior a 0,95, prende-se principalmente com a possibilidade de estimar o tempo em que o produto mantém-se próprio para o consumo. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meqO₂/kg, verifica-se que o azeite 1M poderá, em princípio, ser consumido até 21 meses após a produção, se se mantiver armazenado na condição a 4°C no escuro, e até 15 meses após a produção, na condição FELA. Para as condições FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 1M nas condições FILA e FILN eram 19 e 14, respectivamente (Tabela 10).

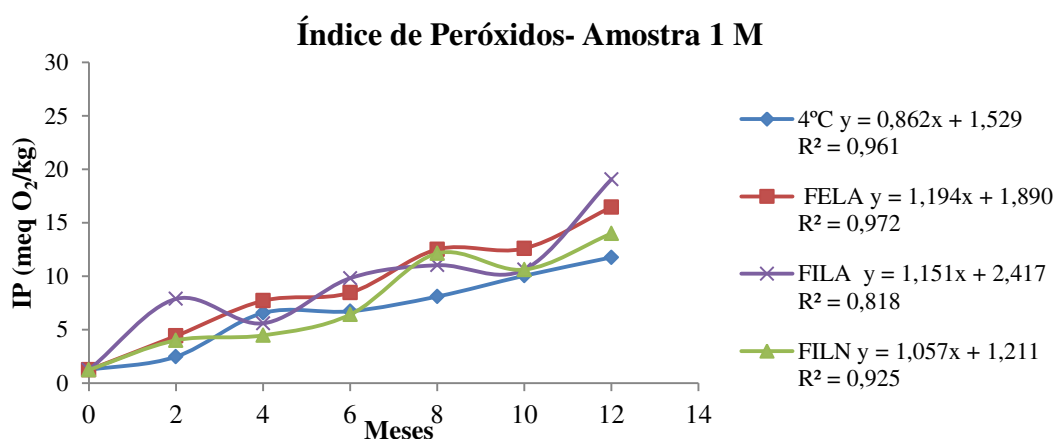


FIGURA 35. Evolução do índice de peróxidos na amostra 1M, ao longo de 12 meses nas quatro condições de armazenamento.

3.1.2. AMOSTRA 2C

As amostras, foram colhidas na Região de Trás-os-Monte e Alto Douro, a recolha ocorreu em 3 etapas da safra 2012/13, tendo sido possível acompanhar todo o processo de obtenção do azeite na primeira recolha, desde a apanha da azeitona no campo, encaminhamento da azeitona até ao lagar e posterior obtenção do azeite. Este azeite virgem extra é monovarietal de azeitona Cobrançosa apresenta cor característica do azeite com tons amarelados.

Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de peróxidos, anisidina, índice de iodo, tocoferóis e teor de clorofila, o qual revelou-se o menor de todas as amostras em estudo: 2,80 mg/kg após 2 meses a 4°C valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O índice de iodo obtido para a condição FELA foi de 80, para as condições FILA e

FILN obteve-se 78 e 75, respectivamente. A amostra apresentou 0,6 mg/L de tocoferóis em todas as condições. Para a anisidina obteve-se um valor médio de $10,24 \pm 2,1$, para $n= 72$, nas quatro condições em estudo. O seu índice de acidez, após 12 meses de armazenamento, a 4°C foi de 0,1 g/100g de ácido oleico, e na condição FILN foi de 0,2 g/100g de ácido oleico.

Em relação ao índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses como mostra a figura 36, tendo aumentado de 3 após 2 meses na condição 4°C para 23, após 12 meses na condição FILA. Sendo assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meqO₂/kg, verifica-se que o azeite 2C, atinge este valor nas condições FELA e FILN ao fim de 11 meses. Para as condições 4°C e FILA os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções, sendo que nestas condições, ao fim de 12 meses, os valores de peróxidos de azeite 2C eram 16 e 23 respectivamente.

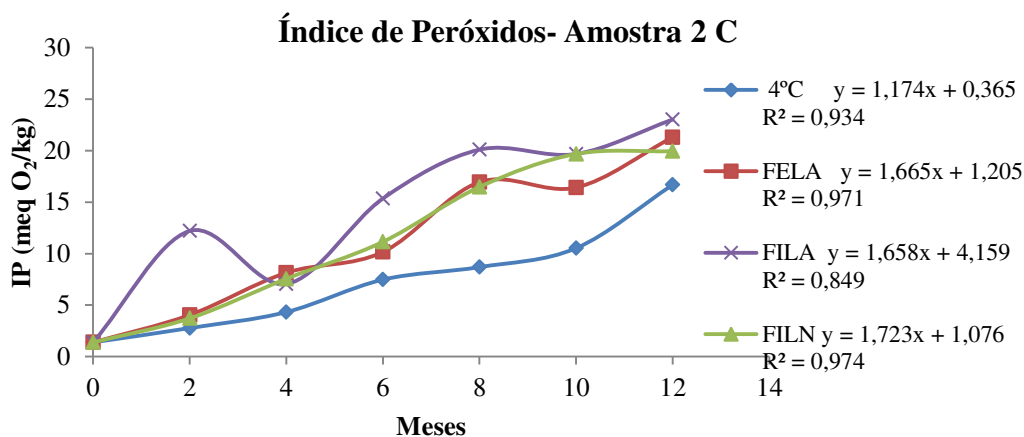


FIGURA 36. Evolução do índice de peróxidos na amostra 2C nas quatro condições de armazenamento

3.1.3. AMOSTRA 3P

As amostras, foram recolhidas na Região do Ribatejo, são amostra de azeite virgem extra monovarietal de azeitona Picual.

Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, anisidina, índice de iodo, tocoferóis índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve um valor inicial de 11,12 mg/kg após 2 meses de armazenamento a 4°C valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA.

O seu índice de acidez, após 12 meses de armazenamento a 4°C foi de 0,3 g/100g ácido oleico, e na condição FILN foi de 0,4 g/100g de ácido oleico. O seu índice de iodo para a condições FELA, foi de 79 FILA e FILN encontrou-se 74, 72, respectivamente. A quantificação de tocoferóis foi de 0,5 mg/L, para a condição 4°C enquanto na condição

FILN foi de 0,3 mg/L. Para a anisidina obteve-se um valor médio de $5,4 \pm 1,3$, para $n=72$, nas quatro condições em estudo.

Para o índice de peróxidos verificámos alterações significativas como mostra a figura 37, tendo passado de 5, após 2 meses na condição 4°C, para 59 após 12 meses na condição FILA. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 3P poderá, em princípio, ser consumido até 17 meses após a produção, se se mantiver armazenado na condição 4°C no escuro, e até 12 meses após a produção, na condição FELA. Para as condições FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 3P nas condições FILA e FILN eram 59 e 27, respectivamente (tabela 10).

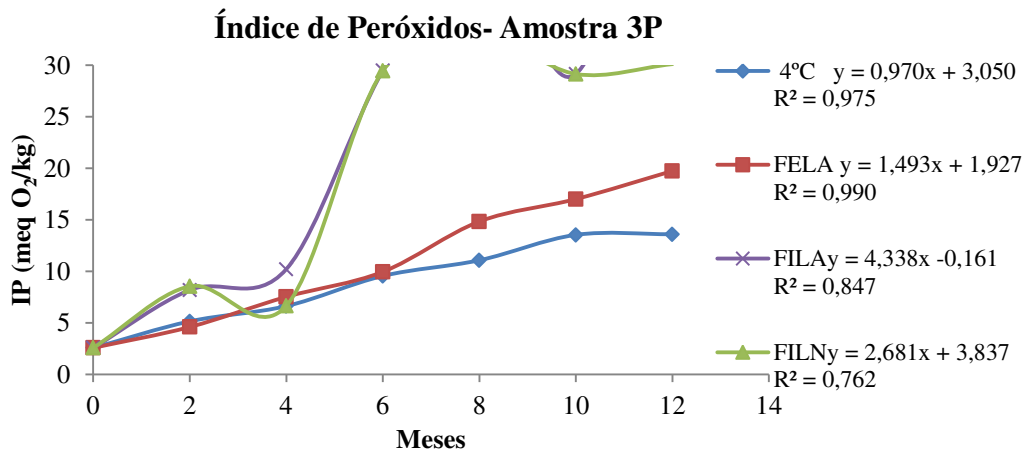


FIGURA 37. Evolução do índice de peróxidos na amostra 3P nas quatro condições de armazenamento

3.1.4. AMOSTRA 4M

As amostras, foram recolhidas na Região da Beira Baixa, em 3 etapas da safra 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra resulta de uma mistura de duas várias variedades de azeitonas Galega e Cobrançosa. Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de peróxidos, anisidina e teor de clorofila, para o qual se obteve um valor inicial de 7,27 mg/kg após 2 meses a 4°C valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez após 12 meses de armazenamento a 4°C foi de 0,3 g/100g de ácido oleico, e na condição FILN foi de 0,4g/100g de ácido oleico. Para a anisidina obteve-se um valor médio de $7,6 \pm 1,5$, para $n=72$, nas quatro condições em estudo. O índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses como mostra a figura 38, tendo passado de 7, após 2 meses na condição 4°C, para 57, após 12 meses na

condição FILA. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 4M poderá, em princípio, ser consumido até 15,9 meses após a produção, se se mantiver armazenado na condição a 4°C no escuro, e até 11 meses após a produção, na condição FELA. Para as condições FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 4M nas condições FILA e FILN eram 57 e 52, respectivamente (tabela 10).

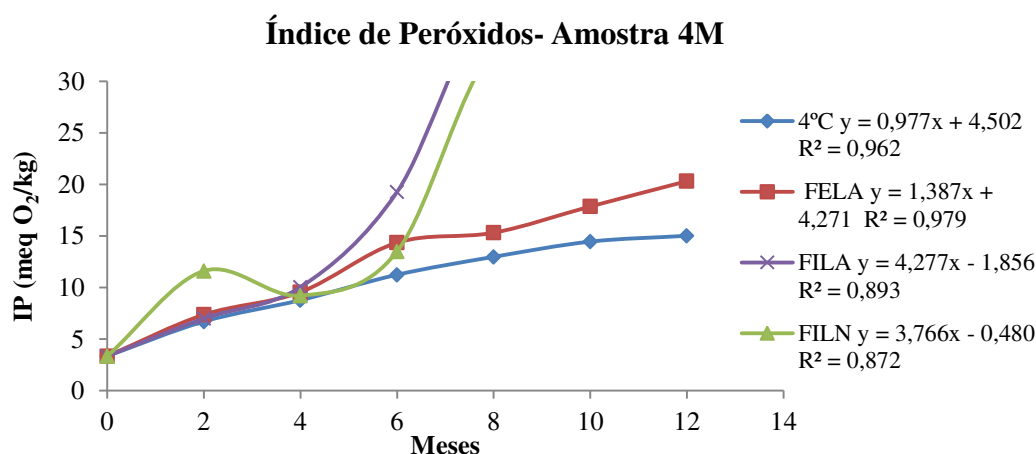


FIGURA 38. Evolução do índice de peróxidos na amostra 4M nas quatro condições de armazenamento

3.1.5. AMOSTRA 5A

As amostras, apresentam cor verde oliva, foram colhidas na Região do Alto Alentejo, em 3 etapas da safra 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra é monovarietal da variedade Arbequina. Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de iodo, tocoferóis, anisidina, índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve um valor inicial de: 6,12 mg/kg após 2 meses a 4°C, valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez foi de 0,1 g/100g de ácido oleico, após 12 meses de armazenamento a 4°C, e na condição FILN foi de 0,2 g/100g de ácido oleico. O seu índice de iodo para foi de 84, 83 e 82 para FELA, FILA e FILN, respectivamente. Para os tocoferóis, foi obtido um valor 0,2 mg/L para a condição 4°C, FELA e FILN. Na anisidina obteve-se um valor médio de $3,3 \pm 1,0$, para n= 72, nas quatro condições em estudo. Já o índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 39, tendo passado de 5, após 2 meses na condição 4°C, para 22, após 12 meses na condição FILA. Assim, visando o valor

máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 5A poderá, em princípio, ser consumido até 11 meses após a produção, se se mantiver na condição a FELA. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 5A nas condições 4°C, FILA e FILN eram 18, 22 e 25, respectivamente (tabela 10).

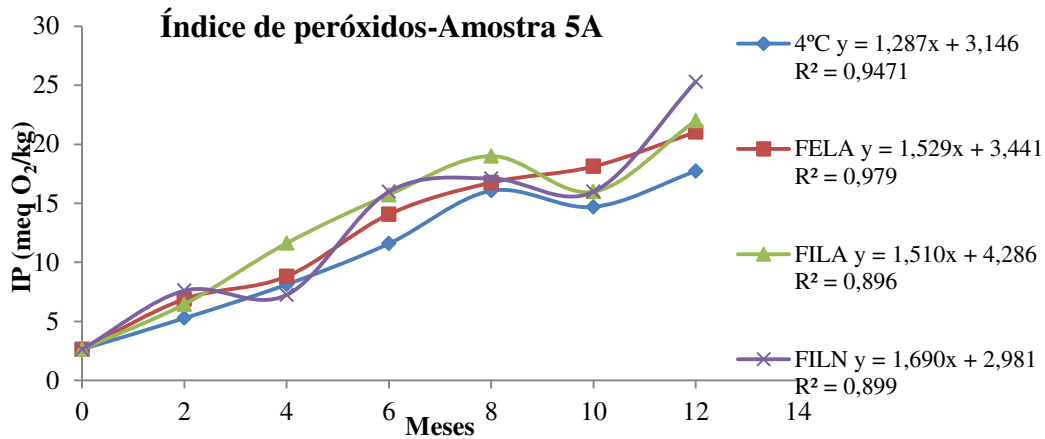


FIGURA 39. Evolução do índice de peróxidos na amostra 5A nas quatro condições de armazenamento

3.1.6. AMOSTRA 5P

As amostras, apresentam cor verde oliva, foram colhidas Região do Alto Alentejo, em 3 etapas da safra 2012/13. Segundo informação do fornecedor, este azeite virgem extra é monovarietal da variedade Picual.

Nesta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de iodo, tocoferóis, anisidina, índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve: 4,75 mg/kg após 2 meses a 4°C valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez após 12 meses de armazenamento a 4°C e a na condição FILN foi de 0,2 g/100g de ácido oleico. O seu índice de iodo foi de 76 para a condição FELA, e de 71 para as condições FILA e FILN. Para tocoferóis a amostra apresentou 0,4mg/L para a condição 4°C e FELA e 0,3 mg/L para a condição FILN. A anisidina teve um valor médio de $5,0 \pm 1,2$, para $n = 72$, nas quatro condições em estudo. O índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 40, tendo passado de 3, após 2 meses na condição 4°C, para 64, após 12 meses na condição FILA. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 5P poderá, em princípio, ser consumido até 15,5 meses após a produção, se se mantiver na condição a 4°C no escuro, e até 12 meses após a produção, se se mantiver na condição FELA. Para as condições

FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 5P nas condições FILA e FILN eram 64 e 21, respectivamente (tabela 10).

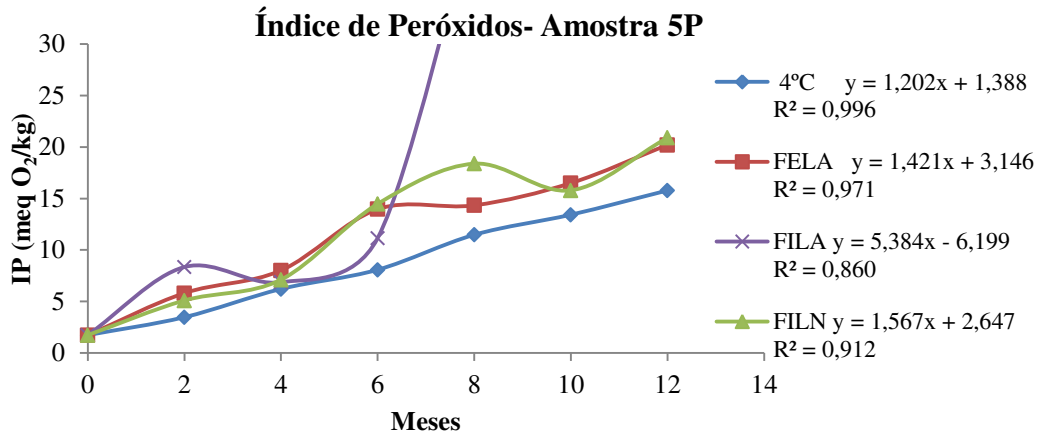


FIGURA 40. Evolução do índice de peróxidos na amostra 5P nas quatro condições de armazenamento

3.1.7. AMOSTRA 6D

As amostras, foram colhidas na Região do Baixo Alentejo, em 3 etapas da safra de 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra resulta de uma mistura de variedades Galega, Cordovil e Verdeal.

Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, anisidina índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve um valor inicial de: 11,58 mg/kg após 2 meses o a 4°C valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez após 12 meses de armazenamento a 4°C e em FILN foi de 0,3 g/100g de ácido oleico. Para a anisidina obteve-se um valor médio de $7,1 \pm 2,1$, para $n = 72$, nas quatro condições em estudo. Já o índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 41, tendo passado de 3, após 2 meses na condição 4°C, para 17, após 12 meses na condição FILA. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 6D poderá, em princípio, ser consumido até 13 meses após a produção, se se mantiver na condição FELA. Para as condições 4°C, FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 6D nas condições 4°C, FILA e FILN eram 14, 17 e 21, respectivamente (tabela 10).

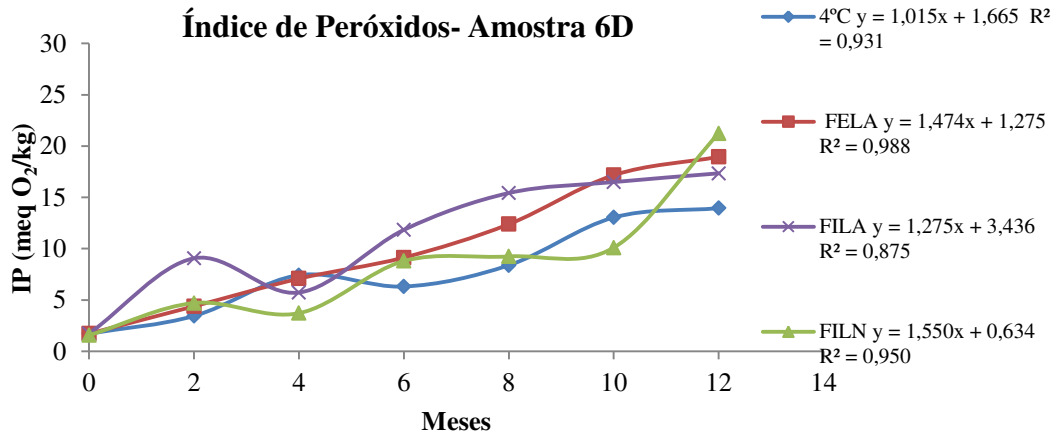


FIGURA 41. Evolução do índice de peróxidos na amostra 6D nas quatro condições de armazenamento

3.1.8. AMOSTRA 6G

As amostras, foram colhidas na Região do Baixo Alentejo, 3 etapas da safra de 2012/13. Segundo o fornecedor, este é um azeite virgem extra monovarietal da variedade Galega. Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, índice de iodo, tocoferóis, anisidina, índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve: 8,16 mg/kg após 2 meses a 4°C, valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez, após 12 meses de armazenamento a 4°C e em FILN foi de 0,5 g/100g de ácido oleico. Para o índice de iodo obtivemos para a condição FELA e FILA 80, e 81 para a condição FILN. Para tocoferóis a amostra apresentou 0,5mg/L para a condição 4°C e FELA e 0,3 mg/L para a condição FILN. Para a anisidina obtivemos um valor médio de $4,1 \pm 1,2$, para $n= 72$, nas quatro condições. O índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 42, tendo passado de 3, após 2 meses na condição 4°C, para 20 , após 12 meses na condição FILA. Contudo, para as 4 condições de estudo factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 6G nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN eram 14, 20, 20 e 22, respectivamente (tabela 10).

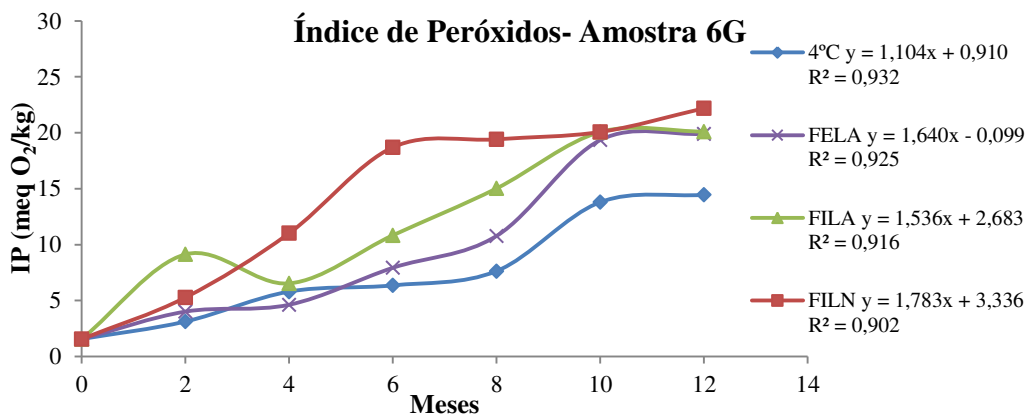


FIGURA 42. Evolução do índice de peróxidos na amostra 6G nas quatro condições de armazenamento

3.1.9. Amostra 6M

As amostras, foram colhidas Região do Baixo Alentejo, em 3 etapas da safra de 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra resulta de uma mistura de variedades Galega, Cordovil e Verdeal.

Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, anisidina, índice de peróxidos e teor de clorofila: 9,31 mg/kg após 2 meses a 4°C, valor que não sofreu alterações significativas ao longo do tempo de estudo para as condições FELA e FILA. O seu índice de acidez após 12 meses de armazenamento a 4°C foi de 0,4 g/100g de ácido oleico, e na condição FILN foi de 0,5 g/100g de ácido oleico. Para a anisidina obtiveram-se um valor médio de $5,3 \pm 1,7$, para $n=72$, nas quatro condições em estudo. Já o índice de peróxidos sofreu alterações significativas ao longo de 12 meses, como mostra a figura 43, tendo passado de 3, após 2 meses na condição 4°C, para 17, após 12 meses na condição FILA. Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, o azeite 6M poderá, em princípio, ser consumido até 13 meses após a produção, na condição FELA. Para as condições 4°C, FILA e FILN obtiveram-se $R^2 < 0,95$ pelo que não se recomendam projecções. Os resultados experimentais mostraram que passados 12 meses os valores de peróxidos do azeite 6M nas condições 4°C, FILA e FILN eram 13, 17 e 21, respectivamente (tabela 11).

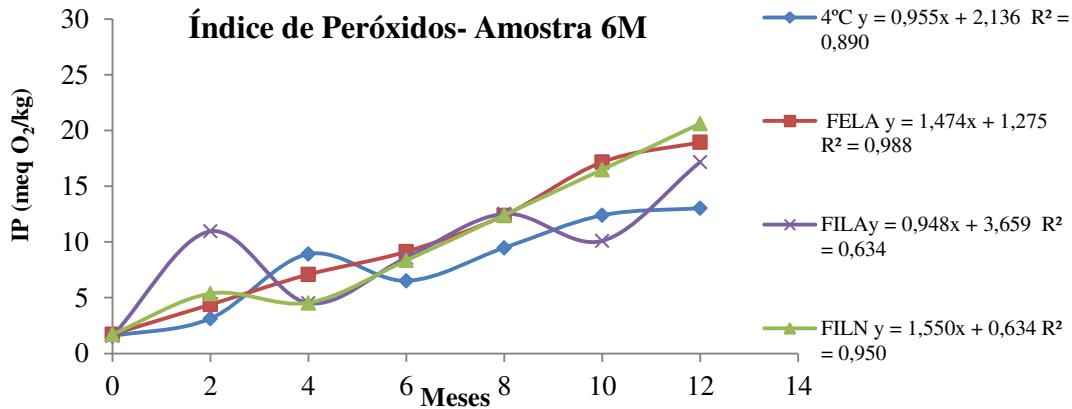


FIGURA 43. Evolução do índice de peróxidos na amostra 6M nas quatro condições de armazenamento

3.1.10. AMOSTRA 7M

As amostras, foram colhidas na região do Algarve, em 3 etapas da safra 2012/13. Segundo o fornecedor, este azeite virgem extra resulta de uma mistura de variedades Maçanilla e Galega. Com esta amostra realizaram-se ensaios de índice de acidez, anisidina, índice de peróxidos e teor de clorofila, para o qual se obteve: 4,25 mg/kg após 2 meses a 4°C, valor que não sofreu alterações significativas para as condições FELA e FILA. O seu valor de índice de acidez, após 12 meses de armazenamento, a 4°C e em FILN, foi de 0,6 g/100g de ácido oleico. Para a anisidina encontrou-se um valor médio de $7,1 \pm 2,6$, sendo $n = 72$. Já o índice de peróxidos sofreu alterações significativas tendo passado de 7, após 2 meses na condição 4°C, para 33, após 12 meses na condição FILA (Fig.44). Assim, tendo em conta o valor máximo de 20 meq O₂/kg, verifica-se que o azeite 7M poderá, em princípio, ser consumido até 13 meses após a produção, se se mantiver na condição FELA. Para as condições 4°C, FILA e FILN os factores de correlação de Pearson foram inferiores a 0,95 pelo que não se recomendam projecções. Passados 12 meses, os valores de peróxidos do azeite 7M nas condições 4°C, FILA e FILN eram 17, 33 e 34, respectivamente (Tabela 10).

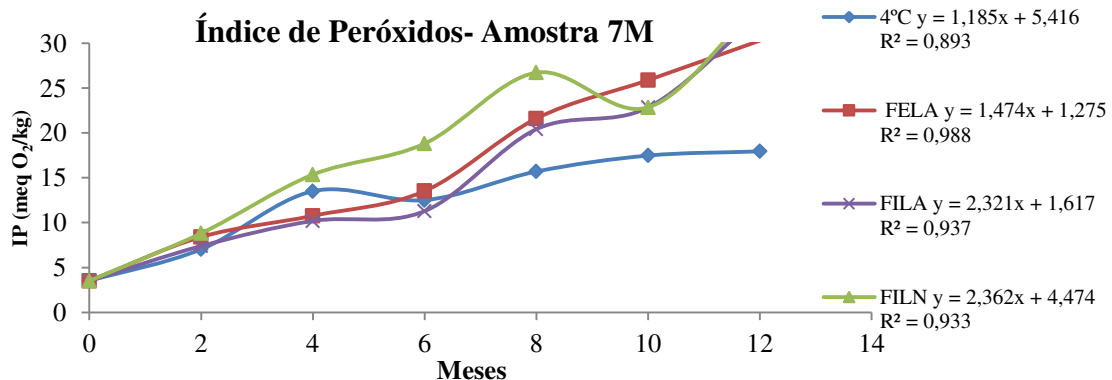


FIGURA 44. Evolução do índice de peróxidos na amostra 7M nas quatro condições de armazenamento

3.2. RESULTADOS DOS PARÂMETROS NO CONJUNTO DAS AMOSTRAS NAS 4 CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

3.2.1. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS

A tabela 10 resume os valores médios obtidos para todas as amostras, em todas as condições deste estudo. As figuras 45 e 46 retratam os resultados em modo gráfico. A figura 47 contém a evolução dos peróxidos de cada amostra, e a respectiva recta média, para cada condição, ao longo de 12 meses.

TABELA 10. Valores médios de índice de peróxidos, em meq O₂/kg, das amostras nas condições de armazenamento 4°C, FELA, FILA e FILN

4°C											
Meses	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M	Média
0	1	1	3	3	3	2	2	2	2	4	2
2	2	3	5	7	5	3	3	3	3	7	4
4	7	4	7	9	8	6	7	9	6	14	8
6	7	7	10	11	12	8	6	7	6	13	9
8	8	9	11	13	16	11	8	9	8	16	11
10	10	11	14	14	15	13	13	12	14	17	13
12	12	17	14	15	18	16	14	13	14	18	15
FELA											
Meses	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M	média
0	1	1	3	3	3	2	2	2	2	4	2
2	8	4	5	7	7	6	4	4	4	8	6
4	4	8	7	10	9	8	7	5	5	11	7
6	8	10	9	14	14	14	9	8	8	14	11
8	13	17	14	15	17	14	12	15	11	22	15
10	13	16	16	18	18	17	17	16	19	26	18
12	16	21	20	20	21	20	19	17	20	30	21
FILA											
Meses	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M	média
0	1	1	3	3	3	2	2	2	2	4	2
2	8	12	8	7	6	8	9	11	9	7	9
4	10	7	10	10	12	7	6	5	7	10	8
6	10	15	29	19	16	11	12	9	11	11	14
8	11	20	43	38	19	43	15	13	15	20	24
10	11	20	29	32	16	-	16	10	18	23	19
12	19	23	59	57	22	64	17	17	20	33	33

FILN											
Meses	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M	média
0	1	1	3	3	3	2	2	2	2	4	2
2	4	4	9	12	8	5	5	5	5	9	6
4	4	8	7	9	7	7	5	4	11	15	8
6	6	11	29	14	16	14	8	9	19	19	15
8	12	16	33	33	17	18	12	9	19	27	20
10	11	20	29	32	16	16	16	10	20	23	19
12	14	20	27	52	25	21	21	21	22	34	26

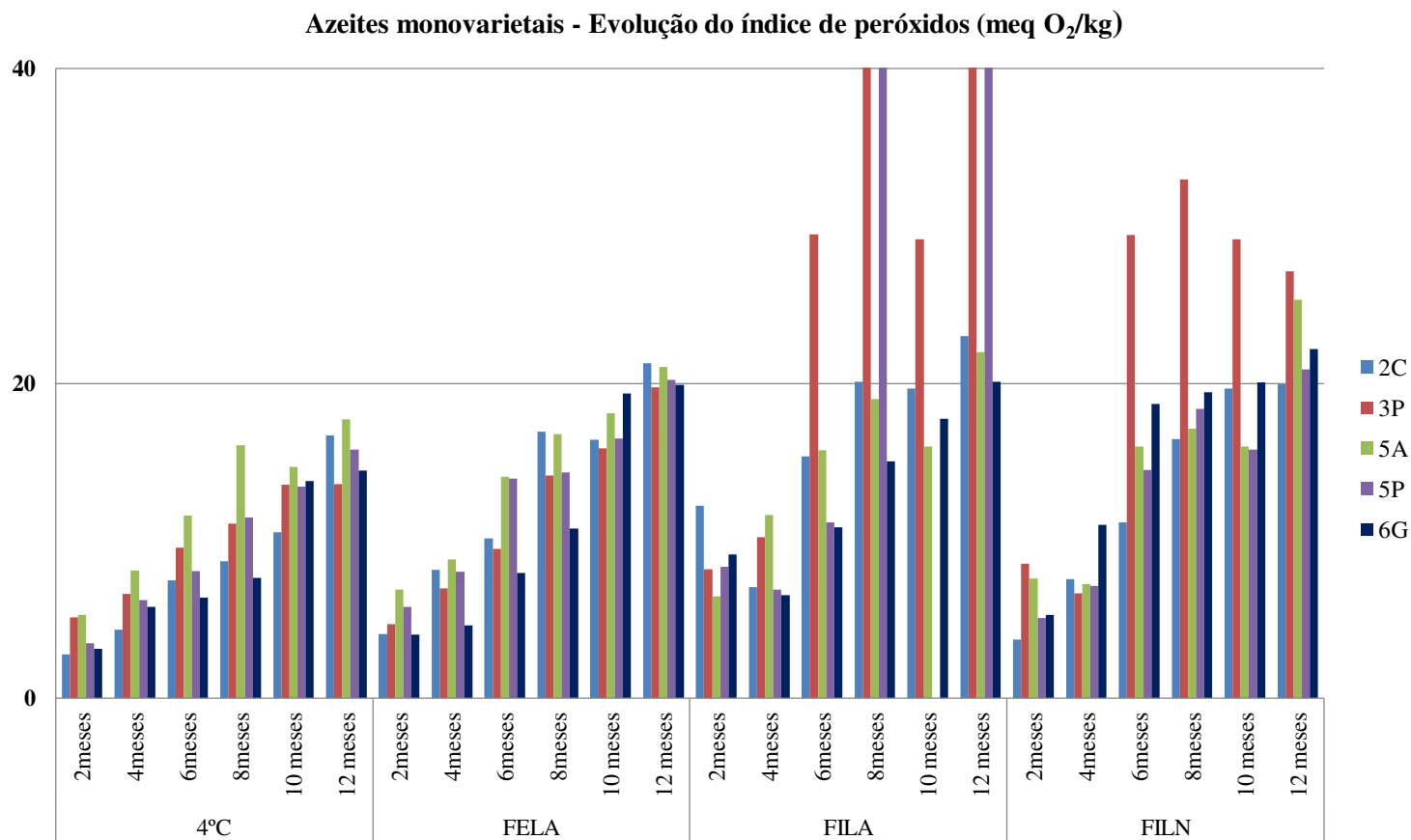


FIGURA 45. Evolução do índice de peróxidos, por azeite monovarietal e por condição de armazenamento, ao longo de 12 meses.

Azeites de mistura - Evolução do índice de peróxidos (meqO₂/kg)

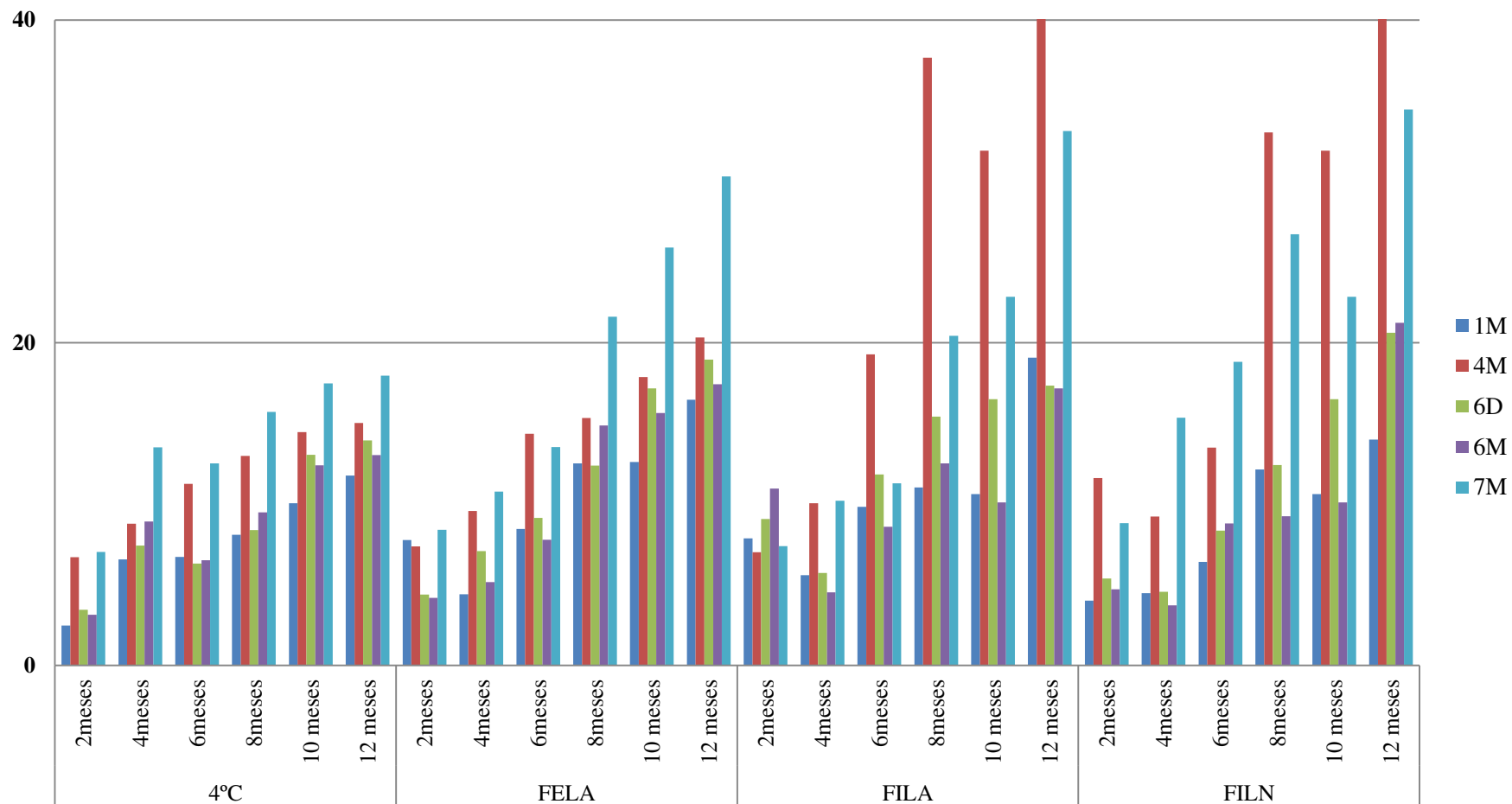


FIGURA 46. Evolução do índice de peróxidos, por azeite de mistura e por condição de armazenamento, ao longo de 12 meses.

Monitorização, ao longo de 12 meses, dos teores de peróxidos, aldeídos e clorofila de azeites virgem extra, monovarietais e de mistura, produzidos em Portugal e armazenados em 4 diferentes condições

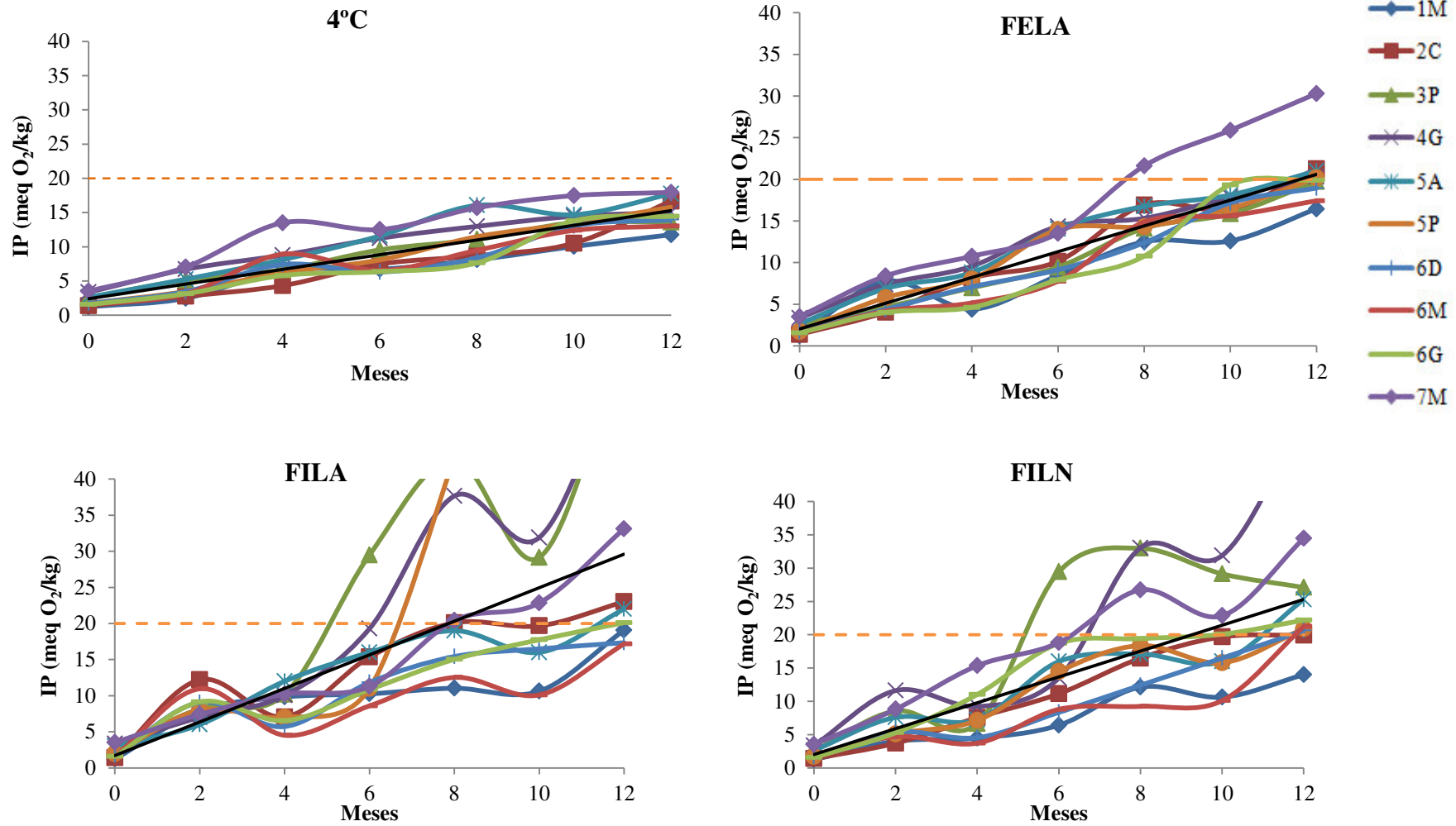


FIGURA 47. Correlação do índice de peróxidos de cada amostra com o tempo de armazenamento, nas condições: 4°C; FELA; FILA; FILN. A preto, em cada gráfico: recta média.

A tabela 11 mostra, para cada condição estudada, a equação obtida pela regressão linear dos resultados de todas as amostras em relação ao tempo, tendo-se adoptado $IP_0 = \frac{1}{2} IP_2$ (Fig. 47). Como pode verificar-se, o armazenamento a 4°C ampliou em 4 meses o tempo estimado de conformidade das amostras, em relação ao armazenamento em FELA, que revelou ser de 12 meses. Por outro lado, e também em relação a FELA, as condições FILN e FILA diminuíram o tempo de conformidade das amostras em 3 e 4 meses, respectivamente. O facto da condição FILA ser mais favorável ao desenvolvimento dos peróxidos que a condição FILN pode ser explicado pelo não controlo da temperatura, isto é, na condição FILN a temperatura variou de 7°C a 40°C, mas o intervalo mais frequente foi 15°C-18°C, verificado em cerca de 60% das medições, enquanto na FILA a temperatura média foi mais elevada, entre 22°C e 26°C.

TABELA 11. Parâmetros da equação da recta média $IP = f(t)$, nas 4 condições de armazenamento, e estimativa do tempo, em meses, para atingir o valor de $IP = 20 \text{ meqO}_2/\text{kg}$

Condição	Equação da recta	Coefficiente de correlação, R ²	Meses para IP = 20
4°C	$y = 1,0731x + 2,4105$	0,9908	16
FELA	$y = 1,5443x + 2,0466$	0,9939	12
FILA	$y = 2,3249x + 1,7203$	0,8973	8
FILN	$y = 1,9405x + 2,0284$	0,9646	9

A estimativa fundamentada do tempo médio de conformidade do IP em várias condições de armazenamento para um conjunto de azeites virgem extra de diferentes variedades, tal como realizado no presente trabalho, é inédita. Contudo, conforme apresentado na tabela 4, vários autores têm estudado o efeito do armazenamento na qualidade do EVOO. A comparação dos resultados deste trabalho com a literatura recente mostra que há concordância em vários aspectos, por exemplo, o facto de temperaturas baixas prolongarem o tempo de conformidade (Gómez-Alonso *et al*, 2007; Mulinacci *et al*, 2013) e também a constatação de que, em condições adequadas, o azeite virgem extra tem uma duração média de 12 meses (Piscopo & Poiana, 2012).

A tabela 12 apresenta os resultados do IP de 4 amostras analisadas em triplicado, no dia 25/10/2013, no CiiEM e no INSA, com vista a validar os procedimentos usados no presente trabalho. Dos resultados nos 2 locais, verificou-se um quociente percentual médio de 10%, que foi considerado satisfatório.

TABELA 12. Comparação de resultados de índice de peróxidos CiiEM & INSA.

Amostra	CiiEM (meq O ₂ /kg)	INSA (meq O ₂ /kg)	Quociente percentual
A = 5A1 FILN	16,7 ±0,4	19,0 ± 0,5	88%
B = 6G2 FILN	19,5 ±0,5	22,3 ± 0,4	87%
C = 5A1 FELA	17,9 ±0,4	17,0 ± 0,1	105% (95%)
D = 6G2 FELA	10,0 ±0,03	11,4 ± 0,2	88%

3.2.2. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE ANISIDINA E DO PARÂMETRO TOTOX

Uma vez que a combinação “temperatura elevada (150°C - 180°C) & tempo curto (30 min – 12 h)” promoveu um grande aumento na concentração dos aldeídos em azeites (Naz *et al*, 2004; Labrinea *et al*, 2001), foi objectivo deste trabalho verificar, através do índice de anisidina, se a combinação “temperatura moderada (4°C - 40°C) & tempo longo (2 meses - 12 meses)” apresentaria um efeito semelhante. Sucede, no entanto, que pelo IpA determinam-se os aldeídos totais do azeite, pelo que, há que ter em conta a existência prévia dos aldeídos naturais da azeitona, ou seja, parte do valor doseado pode dever-se à oxidação secundária e parte aos aldeídos intrínsecos, daí que o índice de anisidina é sempre um valor relativo à variedade e ao estado inicial do azeite.

No presente trabalho, o maior índice de anisidina inicial dos azeites virgem extra monovarietais correspondeu à variedade Cobrançosa (10,2) e o menor à Arbequina (3,0). Estas posições relativas mantiveram-se durante o período de estudo, em todas as condições de armazenamento, como pode ver-se na figura 48. Em relação aos azeites de mistura, o azeite 1M apresentou o maior IpA (14,3) e o 6M o menor (6,0). Os resultados numéricos obtidos nas determinações de anisidina ao longo de 12 meses, nas 4 condições de armazenamento, estão apresentados no anexo C.

A evolução do índice de anisidina, ao longo dos 12 meses deste estudo, ocorreu de modo semelhante para todas as amostras, monovarietais e mistura, como se pode verificar nas figuras 48 e 49. Os valores de IpA em relação ao tempo distribuíram-se como numa sinusoidal, oscilaram em torno de um valor médio, sem uma tendência clara para valores mais altos ou mais baixos, nas 4 condições de armazenamento. Os valores médios e o desvio padrão associado, tendo em conta as 18 medições efectuadas na condição 4°C, para as amostras 1M, 2C, 3P, 4M, 5A, 5P, 6D, 6M, 6G e 7M foram, respectivamente: 12,39 ± 1,65; 10,24 ± 1,74; 5,61 ± 2,17; 6,34 ± 2,03; 2,96 ± 0,98; 4,99 ± 1,04; 5,61 ± 1,91; 6,23 ± 2,64; 4,83 ± 1,60; 6,29 ± 2,11.



FIGURA 48. Evolução do índice de anisidina em azeites virgem extra das variedades Cobrançosa, Picual, Arbequina e Galega ao longo de 12 meses de armazenamento nas condições a 4°C, FELA, FILA e FILN



FIGURA 49. Evolução do índice de anisidina em azeites virgem de mistura, amostras 1M, 4M, 6D, 6M e 7M, ao longo de 12 meses de armazenamento nas condições a 4°C, FELA, FILA e FILN.

Deste modo, concluiu-se que as condições de armazenamento utilizadas não favoreceram a formação de aldeídos, mesmo depois de 12 meses, pelo que, a combinação “temperatura moderada (4°C - 40°C) & tempo longo (2 meses - 12 meses)” resultou num efeito diferente do observado pela combinação “temperatura elevada (150°C - 180°C) & tempo curto (30 min – 12 h)” descrito por Labrinea *et al* (2001) e Naz *et al* (2004) e apresentado na figura 26.

TOTOX

A determinação do índice de anisidina tem sido recomendada por vários autores por forma a calcular-se o parâmetro TOTOX, o qual corresponde à soma do índice de anisidina com o índice de peróxidos- previamente multiplicado por dois, de modo a obter-se um indicador da oxidação total (Caponio *et al*, 2013). No presente trabalho, no entanto, as amostras e as condições utilizadas levaram a que o índice de anisidina não sofresse alterações significativas ao longo do armazenamento, pelo que, dos dois parâmetros envolvidos no cálculo do TOTOX apenas o índice de peróxidos variou. Além disso, como se mostrou nas figuras 48 e 49, alguns azeites possuem valores naturalmente elevados de índice de anisidina sem que isso corresponda a um estágio de oxidação superior ao de outro azeite. Por este motivo, para os fins deste estudo, considerou-se inapropriado apresentar a oxidação dos azeites em relação ao parâmetro TOTOX e portanto manteve-se apenas o índice de peróxidos como indicador.

3.2.3. EVOLUÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA

Os valores determinados correspondem efectivamente à feofitina e não à clorofila (Fig. 28), contudo, a convenção é referir o parâmetro como clorofila (AOCS, 1998).

Tendo em conta os azeites monovarietais, 2C, 3P, 5A, 5P e 6G, os valores médios iniciais, em mg/kg, a 4°C foram 2,80; 11,12; 6,12; 4,75 e 8,16 respectivamente. Como se verifica, o azeite com o valor mais baixo de clorofila foi o 2C, variedade Cobrançosa, enquanto o mais elevado foi do 3P, variedade Picual. No entanto, o resultado da amostra 3P não deve ser atribuído apenas à variedade Picual uma vez que a amostra 5P, também Picual monovarietal, apresentou menos da metade deste valor. A explicação para as diferenças dos teores de clorofila dentro de uma mesma variedade inclui o índice de maturação do fruto usado na manufactura do azeite, conforme já referido no tópico pigmentos do subtítulo 1.6.2. Assim, é de supor que o azeite 3P foi elaborado com azeitonas num estágio de maturação mais inicial que o azeite 5P.

No caso dos azeites de mistura, 1M, 4M, 6D, 6M, 7M, os resultados médios iniciais, em mg/kg, a 4°C foram 12,43; 7,27; 11,58; 9,31 e 4,25, respectivamente. Aqui, para além das diferentes variedades de azeitona que compõem os azeites, é de referir que os valores máximo e mínimo de clorofila também expressam factores geográficos, sendo o maior teor da amostra de Trás-os-Montes e o menor da amostra do Algarve. Também

aqui pode estar em causa o índice de maturação do fruto, uma vez que os frutos amadurecem mais cedo no Algarve.

As figuras 50 e 51 apresentam a evolução dos valores obtidos, nas quatro condições de armazenamento, ao longo de 12 meses, para os azeites monovarietais e para os azeites de mistura, respectivamente. Como se verifica, tanto nos azeites monovarietais como nos de mistura, a variação nos valores de clorofila nas condições em estudo só é facilmente interpretada na condição FILN, em que se nota claramente o decréscimo da clorofila aos 2 meses até a sua ausência já aos 4 meses de armazenamento (Fig. 52). Para as outras condições, 4°C, FELA e FILA, o estudo da evolução da clorofila foi realizado por inferência estatística, com o auxílio do programa informático Statistica versão 12.0 (StatSoft, 2013). Os resultados globais de clorofila constam no anexo C.

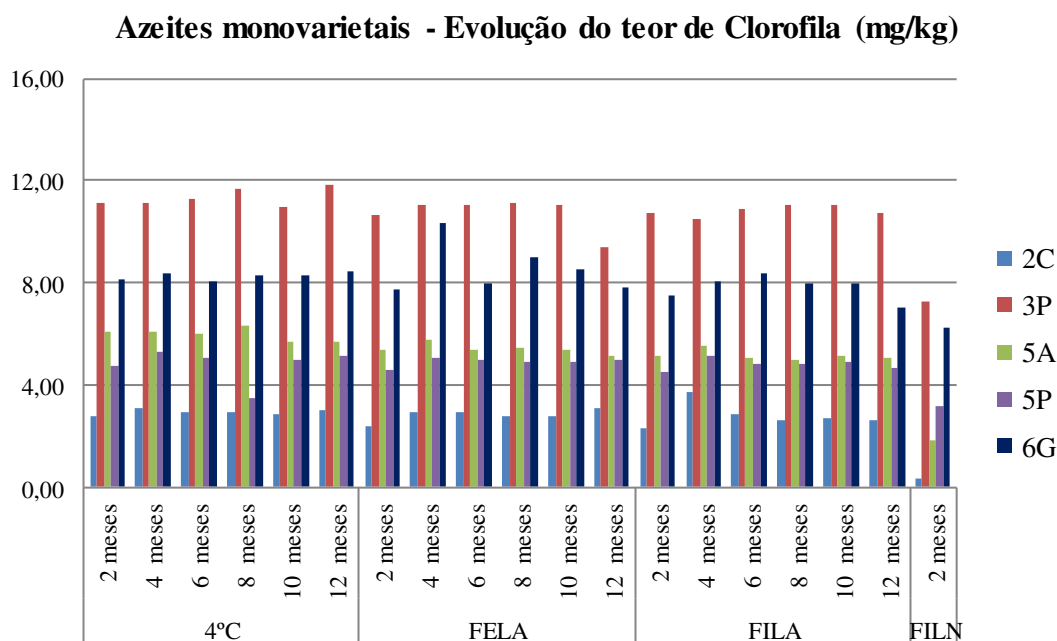


FIGURA 50. Evolução do teor em clorofila (mg/kg) das amostras monovarietais 2C, 3P, 5A, 5P e 6G, ao longo de 12 meses, nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN.

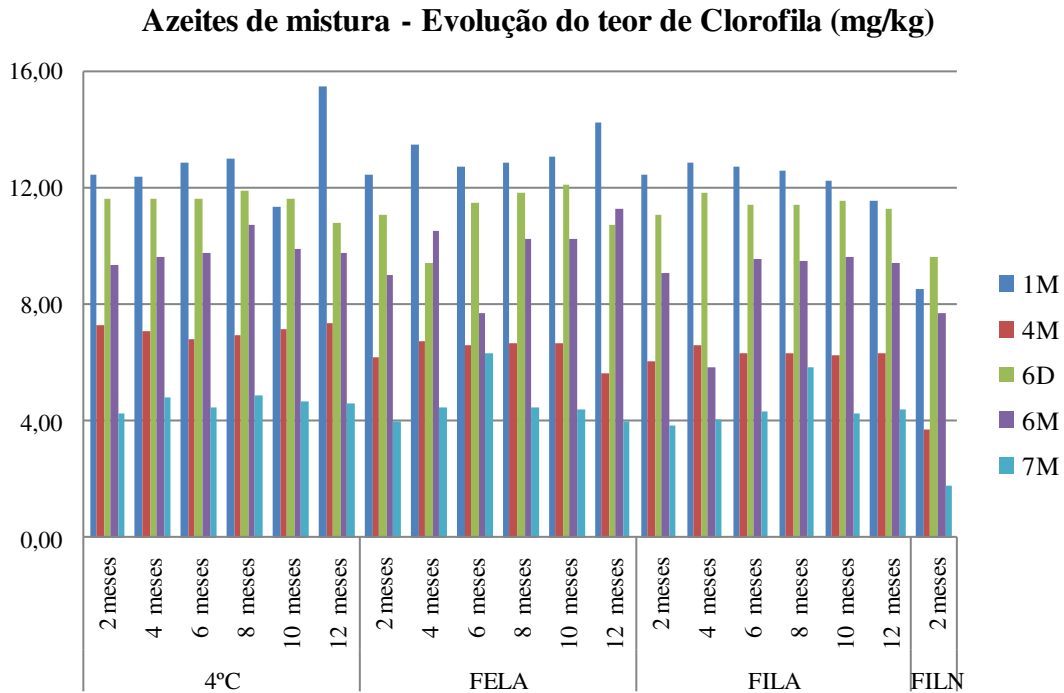


FIGURA 51. Evolução do teor em clorofila (mg/kg) dos azeites de mistura 1M, 4M, 6D, 6M e 7M ao longo de 12 meses, nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN.

A tabela 13, mostra os valores de probabilidade de coincidência de médias dos teores de clorofila ao longo de 12 meses de armazenamento a 4°C no escuro. Foram considerados diferentes, num intervalo de confiança de 95%, os valores de probabilidade, p , inferiores a 0,05 (a vermelho). Como pode ver-se, das dez amostras estudadas, houve quatro amostras (1M, 3P, 4M, 6D) que apresentaram alguma alteração estatística no valor médio sendo que três apresentaram 1 resultado discordante e apenas uma apresentou 2 resultados discordantes (4M). Relativamente, ao tempo mais longo de armazenamento, 12 meses, em apenas uma amostra (1M) o teor de clorofila foi discordante, ou seja, na condição 4°C no escuro, para nove das dez amostras, o resultado de clorofila ao fim de 12 meses manteve-se estatisticamente constante. Assim, adoptou-se considerar que na condição a 4°C as características iniciais da clorofila de cada amostra não são significativamente alteradas em até 12 meses de armazenamento.

TABELA 13. Valores de probabilidade, p , intra-amostra para coincidência de médias dos teores de clorofila ao longo de 12 meses de armazenamento a 4°C no escuro.

Tempo de armazenamento	Amostra									
	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M
2 meses	0,824	0,273	0,639	0,775	0,647	0,970	0,813	0,797	0,701	0,106
4 meses	0,823	0,435	0,109	0,476	0,649	0,499	0,832	0,925	0,676	0,054
6 meses	0,985	0,972	0,919	0,016	0,977	0,646	0,706	0,961	0,462	0,168
8 meses	0,984	0,926	0,432	0,003	0,389	0,176	0,024	0,591	0,998	0,111
10 meses	0,552	0,772	0,012	0,938	0,349	0,646	0,841	0,974	0,922	0,491
12 meses	0,020	0,793	0,367	0,633	0,485	0,414	0,487	0,976	0,225	0,560

A seguir investigou-se se o teor de clorofila podia ser considerado o mesmo em todos os azeites em estudo. Para isso compararam-se os teores médios de cada amostra ($n = 18$) com o valor 7,92 – correspondente ao teor médio da totalidade das amostras ($n = 180$) a 4°C no escuro. Como mostra a coluna p da tabela 14, tendo em conta as 18 medidas realizadas para cada amostra, foi rejeitada a hipótese do seu valor corresponder ao valor médio global. Concluiu-se então que o valor inicial de clorofila não era o mesmo em todos os azeites.

TABELA 14. Valores de probabilidade, p , para coincidência de médias dos teores de clorofila intra-amostra com o valor médio 7,92 inter-amostra.

Amostra	Teste de médias contra um valor constante (value)							
	\bar{x}	σ	N	Std.Err.	Value	t-value	df	p
1M	12,9	3,21	18	0,76	7,92	6,59	17	0,000005
2C	2,9	0,30	18	0,07	7,92	-69,91	17	0,000000
3P	11,3	0,58	18	0,14	7,92	25,05	17	0,000000
4M	7,1	0,48	18	0,11	7,92	-7,42	17	0,000001
5A	6,0	0,46	18	0,11	7,92	-17,85	17	0,000000
5P	4,8	1,01	18	0,24	7,92	-13,21	17	0,000000
6D	11,5	0,72	18	0,17	7,92	21,24	17	0,000000
6M	9,8	2,78	18	0,65	7,92	2,93	17	0,009400
6G	8,3	0,31	18	0,07	7,92	4,78	17	0,000173
7M	4,6	0,25	18	0,06	7,92	-56,21	17	0,000000

Relativamente às outras condições de armazenamento, na figura 52 veem-se as amostras nas cuvets para a determinação da absorvância espectrofotométrica após 4 meses da

produção do azeite. A simples observação visual das amostras permite constatar que as amostras na condição FILN já não apresentam coloração esverdeada.

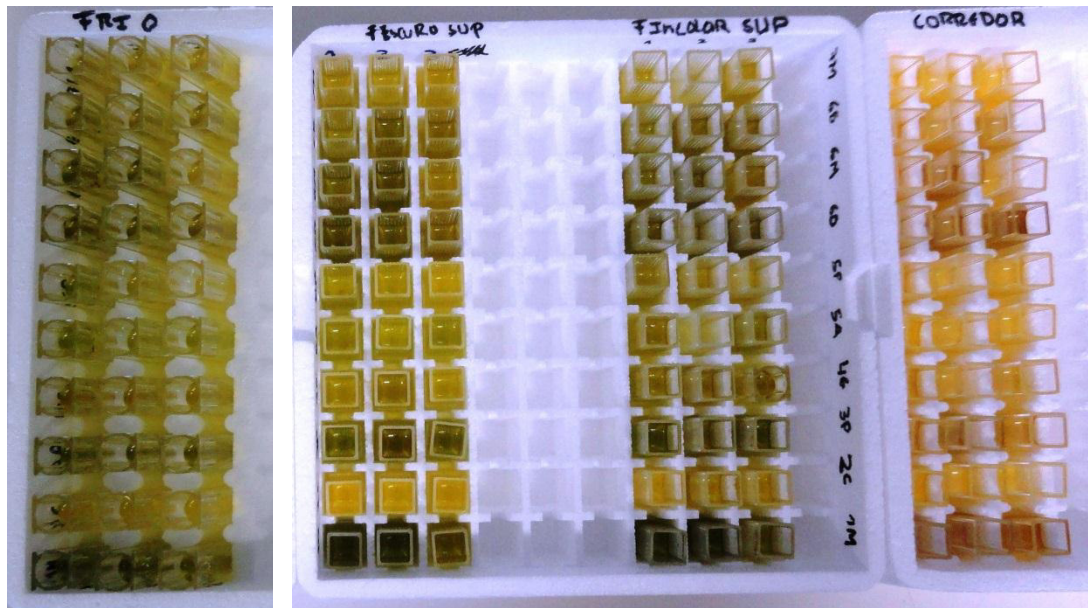


FIGURA 52. Evolução da clorofila após 4 meses da produção do azeite, nas 4 condições de armazenamento (foto Z Morais, 2013).

Para o estudo da clorofila nas condições FELA, FILA e FILN, adoptou-se comparar os resultados temporais de cada amostra com o seu valor médio a 4°C no escuro. A tabela 15 mostra os valores de probabilidade de coincidência de médias desta comparação. Para as condições FELA e FILA, os valores apresentados correspondem aos 12 meses de armazenamento em estudo. No caso da condição FILN os teores de clorofila ficaram abaixo do limite de quantificação a partir do 4º mês e por isso não estão apresentados.

Em relação à condição FELA, seis amostras em dez não apresentaram alteração no teor médio de clorofila durante todo o armazenamento. De entre as quatro amostras com resultados discordantes da média, três (6D, 6G, 7M) apresentaram apenas 1 valor discordante, de entre os 6 medidos e uma (4M) apresentou 2 valores discordantes. No total, realizaram-se 78 medições em que apenas 5 estiveram fora do esperado, ou seja cerca de 93% dos resultados apresentaram conformidade. A partir destes resultados considerou-se que a condição FELA não alterou os valores médios de clorofila ao longo de 12 meses de armazenamento.

Tendo em conta a condição FILA, a tabela 15 indica que apenas quatro amostras (1M, 2C, 6D, 6G) não apresentaram variações ao longo dos 12 meses. Três amostras (3P, 5P,

6M) tiveram 1 valor médio diferente da média geral intra-amostra. Uma amostra (5A) mostrou 2 resultados diferentes e em duas amostras (4M, 7M) houve 4 medidas estatisticamente diferentes dentre as 6 realizadas. Devido a mais de 50% das amostras terem apresentado variação ao longo do estudo, concluiu-se que a condição FILA favorece a alteração no teor de clorofila durante o armazenamento.

De referir que a amostra 4M foi a que apresentou a maior variação nos resultados de clorofila em todas as medições efectuadas (8 em 18) sendo 2 a 4°C no escuro, 2 em FELA e 4 em FILA. Este facto, contudo, não deve ser atribuído directamente à variedade Galega, a principal variedade da mistura, uma vez que na amostra 6G monovarietal praticamente não houve variação (apenas 1 em FELA).

É ainda de mencionar que os resultados estatísticos foram concordantes com os cálculos pontuais, os quais realizaram-se da seguinte maneira: para cada amostra, efectuou-se o quociente percentual entre o teor de clorofila a 12 meses, numa dada condição de armazenamento, e o teor de clorofila inicial, na condição a 4°C; a seguir, calculou-se o quociente percentual médio, tendo em conta todas as amostras. O resultado foi que o teor de clorofila médio, após 12 meses de armazenamento, correspondeu a 98% e a 94% do valor inicial a 4°C, nas condições FELA e FILA, respectivamente. Portanto, para um valor mínimo de 95% de concordância, verificou-se que a condição FELA não alterou o teor em clorofila inicial mas a condição FILA sim, tal como nos resultados estatísticos.

Por último, a condição FILN evidenciou o forte efeito da luz natural na decomposição da clorofila, uma vez que só foi possível efectuar medidas até 2 meses de armazenamento e a partir daí os resultados deram valores nulos.

TABELA 15. Valores de probabilidade, p , de coincidência de médias intra-amostra das condições FELA, FILA e FILN ($n = 3$) comparativamente à média da condição 4°C no escuro ($n = 18$).

Condição de armazenamento	Amostra									
	1M	2C	3P	4M	5A	5P	6D	6M	6G	7M
FELA 2 meses	0,9	0,1	0,2	0,01	0,2	0,1	0,1	0,7	0,3	0,01
FELA 4 meses	0,8	1,0	0,5	0,1	0,7	0,1	0,5	0,7	0,02	0,2
FELA 6 meses	0,9	0,9	0,5	0,1	0,2	0,1	0,9	0,5	0,3	0,5
FELA 8 meses	1,0	0,7	0,7	0,1	0,3	0,1	0,3	0,8	0,2	0,5
FELA 10 meses	1,0	0,6	0,5	0,1	0,2	0,1	0,1	0,8	0,2	0,2
FELA 12 meses	0,6	0,4	0,2	0,01	0,1	0,1	0,04	0,8	0,3	0,1
FILA 2 meses	0,9	0,1	0,3	0,00	0,1	0,1	0,1	0,7	0,1	0,02
FILA 4 meses	1,0	0,2	0,00	0,2	0,04	0,00	0,3	0,04	0,8	0,02

FILA 6 meses	1,0	0,9	0,3	0,00	0,1	0,1	0,6	0,9	0,9	0,1
FILA 8 meses	0,9	0,4	0,5	0,01	0,1	0,1	0,5	0,9	0,3	0,5
FILA 10 meses	0,8	0,5	0,5	0,01	0,2	0,2	0,9	0,9	0,1	0,1
FILA 12 meses	0,1	0,7	0,1	0,1	0,00	0,1	0,2	0,2	0,3	0,02
FILN 2 meses	0,2	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,02	0,31	0,01	0,01

Vários autores têm estudado a degradação da clorofila durante o armazenamento, sendo consensual o efeito da luz na aceleração da sua degradação (Giuliani *et al*, 2011). Relativamente ao tempo de manutenção do teor inicial de clorofila, é também consenso que o tempo é dependente das condições utilizadas no armazenamento. Embora alguns autores tenham proposto um decaimento com cinética de primeira ordem para as variedades Picual e Hojiblanca (Gutiérrez & Fernández, 2002), outros autores consideram que a taxa de degradação das clorofilas depende de vários factores, inclusivamente do tipo e do nível de actividade das enzimas envolvidas no catabolismo da clorofila de cada variedade (Giuliani *et al*, 2011).

3.2.4. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE IODO

O índice de iodo é geralmente usado para caracterizar um azeite aquando da sua produção mas não para indicar alterações resultantes das condições de armazenamento. Este critério deve-se ao facto de, em condições de oxidação, as insaturações C=C converterem-se de *cis* em *trans* de modo que, no cômputo total, o número de insaturações não varia muito. De um modo geral, verifica-se um decréscimo do índice de iodo com o passar do tempo em todos os óleos (Muik, Lendl, Molina-Díaz & Ayora-Cañada, 2005). No caso de se acelerar a oxidação, por exemplo com aquecimento a 160°C, alguns autores observaram uma subida do índice de iodo, devido à formação de dienos conjugados (Muik *et al*, 2005) enquanto outros não referem aumentos relevantes com a temperatura (Naz, Sheikh, Siddiqi & Asad Sayeed, 2004).

No presente trabalho determinaram-se os índices de iodo, das amostras monovarietais de Arbequina, 5A, e Galega, 6G, após 6 meses de armazenamento, e das monovarietais Cobrançosa, 2C, e Picual, 3P e 5P, após 10 meses de armazenamento, nas condições de armazenamento FELA, FILA e FILN. Os resultados das condições FILA e FILN foram comparados percentualmente aos de FELA.

Como se apresenta na tabela 16, para as variedades Arbequina e Galega, o armazenamento até 6 meses, nas condições FILA e FILN, não indicou alteração do

índice de iodo, relativamente à condição FELA. De referir que estas amostras apresentaram diferenças no estado físico a 4°C, sendo a Arbequina líquida e a Galega sólida, o que pode estar relacionados com os seus índice de iodo, de 84 e 81, respectivamente.

No caso das variedades Cobrançosa e Picual, o armazenamento após 10 meses indicou variações 98% e 93% para a Cobrançosa nas condições FILA e FILN enquanto para a Picual o decréscimo foi de 93% em ambas as condições, ou seja, também para a manutenção das insaturações C=C originais, a condição FILN é a menos indicada.

Considerou-se que os resultados deste trabalho foram concordantes com a literatura, no sentido em que as condições mais oxidantes favoreceram um decréscimo no índice de iodo mas tratou-se de um decréscimo de pequena magnitude.

TABELA 16. Índice de iodo das amostras 5A e 6G, após 6 meses de armazenamento, e das amostras 2C e 3P e 5P, após 10 meses de armazenamento, nas condições FELA, FILA e FILN

Após 6 meses				Após 10 meses			
Amostras	FELA	FILA	FILN	Amostras	FELA	FILA	FILN
5A1	84	82	83	2C1	77	79	75
5A2	85	82	84	2C2	79	78	73
5A3	85	84	80	2C3	85	78	76
5A Média	84	83	82	2C Média	80	78	75
5A (%)	100	98	98	2C (%)	100	98	93
6G1	80	81	80	3P1	81	74	73
6G2	82	80	79	3P2	77	76	72
6G3	81	80	81	3P3	100	73	73
6G Média	81	81	80	3P Média	79	74	72
6G (%)	100	100	99	3P (%)	100	94	92
				5P1	77	69	71
				5P2	76	72	69
				5P3	77	72	72
				5P Média	76	71	71
				5P (%)	100	93	93

3.2.5. EVOLUÇÃO DOS TOCOFERÓIS TOTAIS

No presente trabalho utilizou-se o método de Wong (1988) mas sem a remoção prévia dos carotenos, pelo que, os resultados não fornecem os valores absolutos dos tocoferóis. Assim, a interpretação dos resultados fez-se apenas por comparação de uma mesma amostra em várias circunstâncias. Os valores da tabela 17 reportam a evolução

percentual dos tocoferóis de cada amostra analisada, após 10 meses de armazenamento nas condições FELA e FILN, relativamente à condição de 4°C.

Como se pode ver, a condição FELA alterou o teor de tocoferóis em menos de 10%, para todas as variedades. Por outro lado, na condição FILN registaram-se variações significativas, com valores entre 11% e 38% abaixo dos registados a 4°C. O decréscimo dos tocoferóis na condição FILN seguiu a ordem 5A > 3P ~ 5P > 6G > 2C.

TABELA 17. Comparação dos tocoferóis das variedades Cobrançosa, Arbequina, Picual e Galega , após 10 meses de armazenamento nas condições 4°C, FELA e FILN

Amostra	4°C (mg/L)	FELA (mg/L)	FILN (mg/L)
2C1	0,7	0,6	0,6
2C2	0,6	0,5	0,6
2C3	0,6	0,6	0,5
2C Média	0,6	0,6	0,6
2C (%)	100	90	89
3P1	0,4	0,4	0,2
3P2	0,7	0,7	0,6
3P3	0,4	0,3	0,2
3P Média	0,5	0,5	0,3
3P (%)	100	91	65
5A1	0,2	0,2	0,2
5A2	0,2	0,2	0,1
5A3	0,3	0,3	0,2
5A Média	0,2	0,2	0,2
5A (%)	100	96	62
5P1	0,4	0,4	0,2
5P2	0,4	0,4	0,3
5P3	0,5	0,5	0,3
5P Média	0,4	0,4	0,3
5P (%)	100	94	67
6G1	0,5	0,5	0,4
6G2	0,4	0,5	0,3
6G3	0,5	0,5	0,3
6G Média	0,5	0,5	0,3
6G (%)	100	105	70

3.2.6. EVOLUÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez reflecte, principalmente, as condições iniciais do processo de produção do azeite, nomeadamente o estado de sanidade da azeitona aquando da colheita e processamento, e as temperaturas de extracção do azeite (APA-PE, 2012), de modo que a condição de armazenamento pode ter uma importância menos relevante.

A figura 53 mostra que mesmo após 12 meses de armazenamento todas as amostras mantiveram-se na categoria virgem extra, ou seja, índice de acidez < 0,8g/100g de ácido oleico, seja na condição a 4°C seja na condição FILN, mais drástica. De referir que o maior índice de acidez foi apresentado pela amostra 7M. Os valores globais do índice de acidez estão apresentados no anexo C.

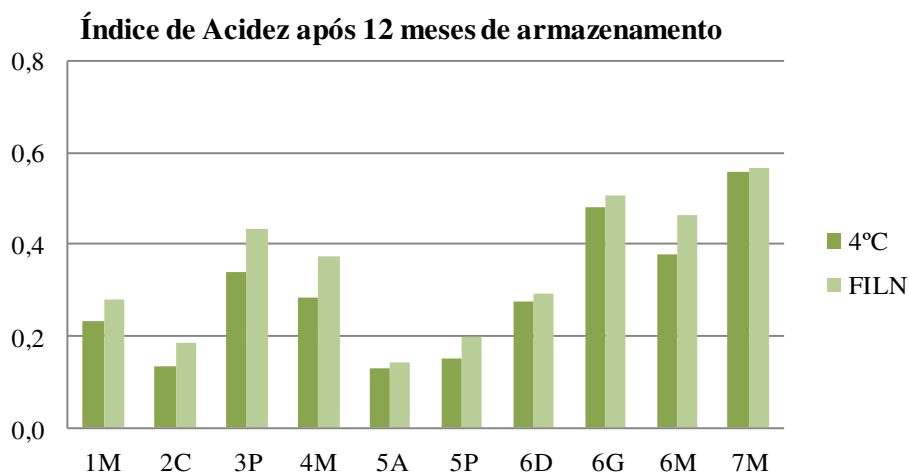


FIGURA 53. Índice de acidez (g/100g ácido oleico) das amostras em estudo após 12 meses de armazenamento, nas condições a 4°C e FILN.

3.3. RESUMO DOS RESULTADOS

TABELA18. Resumo dos resultados

Parâmetro analisado	Resultado
ÍNDICE DE PERÓXIDOS	Em média, os tempos estimados para atingir o valor máximo de IP nas condições 4°C, FELA, FILA e FILN foram de 16, 12, 8 e 9 meses, respectivamente. Dos 10 azeites estudados, na condição FELA, a amostra 1M apresentou a maior estimativa de conformidade (15,2 meses) e a amostra 5A a menor (10,8 meses).
ÍNDICE DE ANISIDINA	Não se observaram alterações significativas no índice de anisidina, ao longo de 12 meses de armazenamento, nas 4 condições estudadas, para todas as amostras.
TOTOX	Uma vez que não houve alteração no índice de anisidina, para os fins deste estudo, considerou-se inapropriado apresentar a oxidação dos azeites em relação ao parâmetro TOTOX e portanto manteve-se apenas o índice de peróxidos como indicador.
CLOROFILA	Nas condições 4°C no escuro e FELA, não se observaram alterações significativas no teor de clorofila, ao longo de 12 meses de armazenamento. A condição FILA favorece o decréscimo dos teores de clorofila, havendo azeites mais sensíveis que outros. A amostra 4M foi particularmente sensível. O teor de clorofila médio, após 12 meses de armazenamento, correspondeu a 98% e a 94% do valor inicial a 4°C, nas condições FELA e FILA, respectivamente. Na condição FILN, as amostras apresentaram valores de clorofila significativamente inferiores ao inicial já no 2º mês de armazenamento: em média, apenas 58% do teor inicial.
ÍNDICE DE IODO	Observou-se uma tendência de decréscimo em todos os azeites estudados. Os decréscimos foram mais acentuados na condição FILN. O caso extremo foi de 93% do inicial, após 10 meses de armazenamento, amostra 3P.
TOCOFERÓIS	Observou-se uma tendência de decréscimo em relação à condição a 4°C, sobretudo na condição FILN, em que o azeite mais sensível foi o da variedade Arbequina (62%), seguida da Picual (66%), Galega (70%) e Cobrançosa (89%), respectivamente.
ÍNDICE DE ACIDEZ	Todas as amostras mantiveram o índice de acidez inferior a 0,8 durante os 12 meses deste estudo, tanto na condição a 4°C como na condição FILN.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em conta as condições de armazenamento adoptadas, os parâmetros que apresentaram as maiores variações ao longo de 12 meses foram o índice de peróxidos e o teor de clorofila. Relativamente aos outros parâmetros estudados, verificou-se que o índice de anisidina não é adequado para monitorizar a oxidação secundária em condições de temperatura ambiente; as grandes variações descritas na literatura ocorrem em temperaturas elevadas, como é o caso da fritura, por exemplo. Do mesmo modo, o índice de acidez revelou-se inadequado para avaliar a qualidade do armazenamento do produto, uma vez que manteve-se constante em condições muito diferentes.

Não se encontrou uma relação de proporcionalidade entre a oxidação do azeite, com formação de peróxidos, e o desaparecimento dos seus antioxidantes lipofílicos naturais, tocoferóis e clorofila. A evolução dos peróxidos apresentou uma taxa de crescimento superior à do decréscimo dos tocoferóis; a sua determinação, pelo método utilizado no presente trabalho, não contribuiu para esclarecer a prevalência dos valores de peróxidos da amostra Picual relativamente à Arbequina, por exemplo, apesar da Picual possuir valores de tocoferóis mais elevados. Também a influência da clorofila não foi clarificada pois, nas condições FELA e FILN, os peróxidos a 10 meses de armazenamento são muito semelhantes apesar de, em FELA, a clorofila estar quase intacta e, em FILN, já ter sido toda destruída.

A partir do índice de peróxidos nas condições estudadas, sugere-se que o consumidor seja informado sobre a importância do tipo de armazenamento na qualidade do azeite virgem extra. Produtos destinados à exportação para regiões longínquas e quentes deveriam ser transportados em contentores refrigerados e comercializados em embalagens de menor volume que as utilizadas dos países produtores, por forma a evitar o consumo de um azeite em condições de inconformidade.

5. Bibliografia

- Agostoni, C. V., Bresson, J. L., Tait, S. F., Flynn, A., Golly, I., Korhonen, H., ... & Verhagen, H. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), anti-inflammatory properties (ID 1882), contributes to the upper respiratory tract health (ID 3468), can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract (3779), and contributes to body defences *EFSA journal*, 9(4), 2033-1.
- Antica (2014). Disponível em <http://www.anticaoliveoil.com/> Consultado em 08/06/2014.
- AOAC, Association of Official Agricultural Chemists (1997). Iodine Value (Wijs), Official Method 993.20.
- AOCS, American Oilseed Chemists' Societies (1998). Chlorophyll content, method Ch 4-91.
- APA-PE (2012). Olive Oil Reference Book. Disponível em http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/APP_Olive_Oil_Reference_Book.pdf. Consultado em 25/05/2014.
- ArteOliva (2014). Disponível em <http://www.arteoliva.com/index.php?lang=en> Consultado em 08/06/2014.
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1-15.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Food Chemistry 3rd edition, Springer, 2004, pp-207.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M.D., Fregapone, G., Lercker, G. (2010). Stability of the Sensory Quality of Virgin Olive Oil During Storage an Overview. *Italian Food & Beverage Technology – LX*, March – 5-18. Disponível em http://www.uclm.es/grupo/gao/com/2010-Stability_sensory_VOO-IBTi.pdf
- BES (2013). Sector Primário Português, Breve Caracterização. Disponível em <http://www.bes.pt/sitebes/cms.aspx?plg=ec46e298-a1fc-4cfb-a73b-d097dadf62f3> consultado em 12/05/2014.
- Boudalis, A. K. & Liatsi, P (2013). Aitolia Natural Products. Disponível em <http://aitolia.com/quality-criteria#top>. Consultado em 25/05/2014.
- Caponio, F., Chiavaro, E., Paradiso, V. M., Paciulli, M., Summo, C., Cerretani, L., & Gomes, T. (2013). Chemical and thermal evaluation of olive oil refining at different oxidative levels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(10), 1146-1154.
- Casa do Azeite (2014) disponível em <http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Dados-sector/Consumo>. Consultado em 12/05/2014.
- CEPAAL, Centro de Estudos e Promoção do Azeite do Alentejo (2013). Disponível em <http://www.azeitesdoalentejo.com/layout.asp?m1=1&m2=3> e <http://www.azeitedoalentejo.pt/azeite-do-alentejo.html> , Consultado em 30/3/2014.
- Codex Alimentarius (2003). Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils, Codex Stan 33-1981 (Rev. 2-2003). Disponível em <http://www.justice.gov.md/file/Centrul%20de%20armonizare%20a%20legislatiei/Baza%20de%20date/Materiale%202008/Legislatie/Acquis/RO/Codex%2033-1981.PDF>. Consultado em 20/05/2014.
- Companhia do Azeite (2013). A azeitona. Disponível em <http://www.companhiadoazeite.com.br/?p=73> Consultado em 12/05/2014

- CONFAGRI (2008). Denominações do azeite. Disponível em <http://www.confagri.pt/Azeite/Pages/Denominacoes.aspx>. Consultado em 23/05/2014.
- Conselho Oleícola Internacional COI, disponível em <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/666-year-2014-news/474-concurso-internacional-de-aceites-de-oliva-irgenes-extra-2014-premio-a-la-calidad-del-coi-mario-sol>. Consultado em 23/05/2014
- Covas, M. I., Konstantinidou, V., & Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 54(6), 477-482.
- Custódio, T. A. S. (2012). Azeites virgem extra comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade. Mestrado em Controlo de Qualidade. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- des Gachons, C. P., Uchida, K., Bryant, B., Shima, A., Sperry, J. B., Dankulich-Nagrudny, L., ... & Breslin, P. A. (2011). Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *The Journal of Neuroscience*, 31(3), 999-1009.
- Di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M. L., & Serraiocco, A. (2002). Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y aceites*, 53(2), 179-186.
- DMG, Depósito da Marinha Grande (2014). Disponível em <http://www.dmg.com.pt/alimentar.html>. Consultado em 12/06/2014.
- DREAlentejo (2013). Esquema das etapas do processo de obtenção de azeite virgem. Disponível em <http://esec-ponte-sor.drealentejo.pt/azeite/lagar.htm>. Consultado em 23/05/2014
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., Rallo, L., Luque-de Castro, M. D., & León, L. (2012). Phenolic composition of virgin olive oils from cross breeding segregating populations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(5), 542-551.
- Erol-Dayi, Ö., Arda, N., & Erdem, G. (2012). Protective effects of olive oil phenolics and gallic acid on hydrogen peroxide-induced apoptosis. *European journal of nutrition*, 51(8), 955-960.
- Ferraz, M. M. P. F. (2012). Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente - Perfil de Engenharia Sanitária. FCT-UNL.
- Filipe (2014). Apanha da azeitona no Alentejo. Disponível em <http://chillicomtodos.com/apanha-da-azeitona-no-alentejo/> Consultado em 12/05/2014
- Firmino, T (2010). Tem dois mil anos, é uma oliveira e vive no Algarve. Jornal Público. Disponível em http://ecosfera.publico.pt/biodiversidade/Details/tem-dois-mil-anos-e-uma-oliveira-e-vive-no-algarve_1436985. Consultado em 11/05/2014.
- Frankel, E. N. (1984). Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in lipid research*, 23(4), 197-221.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., & Bessler, T. R. (1979). Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: V. Photosensitized oxidation. *Lipids*, 14(12), 961-967.
- Frankel, E. N. (1998). Lipid Oxidation, *The Oil Press Dundee*, UK.
- Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(22), 5179-5188.

- Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., & Desamparados Salvador, M. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European journal of lipid science and technology*, 108(2), 134-142.
- Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frias, M. L., & Fernández, A. (1991). Elaboracion de aceite de calidad. *Consejería de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes*, 5/92., Sevilla.
- Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2002). Distribution of chlorophylls and carotenoids in ripening olives and between oil and alperujo when processed using a two-phase extraction system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(1), 105-109.
- Garcia, B., Magalhães, J., Fregapane, G., Salvador, M. D., & Paiva-Martins, F. (2012). Potential of selected Portuguese cultivars for the production of high quality monovarietal virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), 1070-1082.
- Gargouri, B., Zribi, A., & Bouaziz, M. (2014). Effect of containers on the quality of Chemlali olive oil during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 1-12.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78(2), 207-211.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(7), 678-690.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food chemistry*, 100(1), 36-42.
- Gouvinhas, I., Machado, J., Gomes, S., Lopes, J., Martins-Lopes, P., & Barros, A. I. (2014) Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Monovarietal and Commercial Portuguese Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1-7.
- GPP, Gabinete de Planeamento e Políticas (2014). Ministério da Agricultura. Disponível em: <http://www.gpp.pt/MA/Rotulagem/Azeite/AzeiteRotulagem.html>, consultado em 23/05/2014.
- Graça, P. (2014). Breve história do conceito de dieta Mediterrânica numa perspetiva de saúde. *Fatores de Risco*, 31, 20-22. Disponível em <http://www.spc.pt/DL/RFR/artigos/501.pdf>. Consultado em 20/05/2014
- Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food chemistry*, 77(4), 503-510.
- Gutiérrez, F., & Fernández, J. L. (2002). Determinant parameters and components 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(3), 571-577.
- Hsu, C. Y., Chao, P. Y., Hu, S. P., & Yang, C. M. (2013). The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 1.
- Hudson, B. J. F., Gordon, M. H., Allen, J. C., & Hamilton, R. J. (1994). Rancidity in Foods. *Blackie Academic & Professional, Glasgow*, 54-67.
- ISO, International Organization for Standardization (2006). Animal and vegetable fats and oils -- Determination of anisidine value, Official Method 6885.
- Jacobsen C (2013), Oxidative degradation products from omega-3 fatty acids: Identification, quantification and implications for human health. *BIOPROSP, Tromsø*. Disponível em <http://mabit.no/sites/mabit.no/files/S11%20Charlotte%20Jacobsen.pdf>. Consultado em 30/4/ 2014.

- Keys, A. (1980). *Seven countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. Harvard University Press.
- Kiritsakis, A., & Christie, W. W. (2000). Analysis of edible oils. In *Handbook of olive oil* (pp. 129-158). Springer US.
- Koseoglu, O., & Unal, M. K. (2004, September). The effect of phenolic compounds on the quality and stability of virgin olive oil. In *V International Symposium on Olive Growing 791* (pp. 655-663).
- Labrinea, E. P., Thomaidis, N. S., & Georgiou, C. A. (2001). Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica chimica acta*, 448(1), 201-206.
- Leite, R. C. S. (2007). Degradação ambiental de óleo diesel aditivado e em mistura com biodiesel. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Estadual de Londrina. Disponível em http://www.uel.br/grupo-pesquisa/meioambiente/fotopetro/arquivos/mestrado/rosa_cristina_souza_leite.pdf. Consultado em 08/06/2014.
- LET-ISA-UL (2014). Preçário dos Ensaio em Azeite. Disponível em http://www.isa.utl.pt/files/pub/ee/un_especiais/precario_let_2014_final.pdf. Consultado em 12/06/014.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Maia, L. M. J. (2006). Azeites DOP: Avaliação dos Carotenoides Maiores (β-Caroteno e Luteína). Dissertação de mestrado em Controlo da Qualidade, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Mancebo-Campos, V., Fregapane, G., & Desamparados Salvador, M. (2008). Kinetic study for the development of an accelerated oxidative stability test to estimate virgin olive oil potential shelf life. *European journal of lipid science and technology*, 110(10), 969-976.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2014). Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40° C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food chemistry*, 150, 374-381.
- Méndez, A. I., & Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18(5), 521-529.
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., & Ayora-Cañada, M. J. (2005). Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 134(2), 173-182.
- Mulinacci, N., Ieri, F., Ignesti, G., Romani, A., Michelozzi, M., Creti, D., ... & Calamai, L. (2013). The freezing process helps to preserve the quality of extra virgin olive oil over time: A case study up to 18months. *Food Research International*, 54(2), 2008-2015.
- Naz, S., Sheikh, H., Siddiqi, R., & Asad Sayeed, S. (2004). Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chemistry*, 88(2), 253-259.
- Naz, S., Siddiqi, R., Sheikh, H., & Sayeed, S. A. (2005). Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Research International*, 38(2), 127-134.
- Nestle, M. (1995). Mediterranean diets: historical and research overview. *The American journal of clinical nutrition*, 61(6), 1313S-1320S.

NP, Norma Portuguesa (1987). Determinação do índice de acidez em amostras de azeite, Método 903. IPQ.

NP, Norma Portuguesa (1987). Gorduras e óleos comestíveis: determinação do índice de peróxido, Método 904. IPQ.

OTG Olive Tree Growers (2014). How long before I get fruit? Disponível em <http://olivetreegrowers.com/faq.php#24> consultado em 12/05/2014.

Paiva-Martins, F., & Pinto, M. (2008). Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5582-5588.

Peres, F., Jeleń, H. H., Majcher, M. M., Arraias, M., Martins, L. L., & Ferreira-Dias, S. (2013). Characterization of aroma compounds in Portuguese extra virgin olive oils from Galega Vulgar and Cobrançosa cultivars using GC–O and GC× GC–ToFMS. *Food Research International*, 54(2), 1979-1986.

Peres, M. F., Henriques, L. R., Simões-Lopes, P., & Pinheiro-Alves, M. C. (2003). Azeites da ‘Galega Vulgar’ - efeito do loteamento e do armazenamento. *Actas Portuguesas de Horticultura*, nº 13, 186-191.
Pristouri, G., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2010). Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food control*, 21(4), 412-418.

Piscopo, A., & Poiana, M. (2012). Packaging and Storage of Olive Oil. *Olive germplasm—the olive cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. InTech*, 201-222.

Pristouri, G., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2010). Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food control*, 21(4), 412-418.

PROSODOL (2011) Olive Oil Production in the Mediterranean. Disponível em <http://www.prosodol.gr/?q=node/203> Consultado em 12/05/2014.

Ramirez-Tortosa, M. C., Granados, S. E. R. G. I. O., Quiles, J. L., & Yaqoob, P. (2006). Chemical composition, types and characteristics of olive oil. *Olive oil and health*, 45-61.

Regulamento (CEE) nº 2092/91 do Conselho, de 24 de Junho de 1991. Disponível em <http://www.proder.pt/ResourcesUser/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Comunit%C3%A1ria/Regulamenton%C2%BA2092-91.pdf>. Consultado em 23/05/2014.

Regulamento (CE) n.º 2568/91 de 11 de Julho, disponível em http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.spcna.pt%2Fdownload.php%3Fpath%3Dpdfs%26filename%3DSPCNA_20081221211237_Reg__CE__n__2568_91_de_11_07.pdf&ei=0Ht_U97tCOq20wWJr4DoCQ&usq=AFQjCNFpxR71LQb8VObMa1r4H1eE15Q65A&bvm=bv.67720277,d.bGQ. Consultado em 23/05/2014.

Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006. Disponível em http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/5/19/Regulamento%20CE%20510_2006_Protec%C3%A7%C3%A3o%20IG%20DO%20Prod%20Agr%C3%ADcolas%20G%C3%A9neros%20Aliment.pdf. Consultado em 23/05/2014.

Regulamento (CE) nº 1234/2007, do Conselho de 22 de Outubro de 2007. Disponível em http://www.gpp.pt/MA/PO_FH/Reg_1234_cons.pdf. Consultado em 23/05/014.

Regulamento (CE) nº 640/2008 da Comissão de 4 de Julho de 2008, que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. Disponível em http://www.esac.pt/noronha/legislaliminar/regulamento_640_2008_azeites.pdf. Consultado em 23/05/2014.

Regulamento (UE) nº 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011, que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. Disponível em http://www.consulai.com/newsletter/15/pdf/R_CE_61_2011.pdf. Consultado em 27/05/2014.

Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M. J., Quesada-Granados, J. J., Villalón-Mir, M., & Serrana, H. L. G. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2), 194-204.

Bosque-Sendra, J. M., De La Mata-Espinosa, P., Cuadros-Rodríguez, L., González-Casado, A., Rodríguez-García, F. P., & García-Toledo, H. (2011).

SIAZ, Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa (2014). Ministério da Agricultura e do Mar. Disponível em <http://www.gpp.pt/estatistica/SIAZ/>, consultado em 12/05/2014.

Silva, L. M. (2008). Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Disponível em <http://hdl.handle.net/10216/64173>. Consultado em 08/06/2014.

Sousa C. (2009). Variedades de Oliveira. DRAP Centro. Disponível em http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/variedades_de_oliveira.pdf Consultado em 12/05/2014.

StatSoft (2013). Statistica, data analysis software system version 12.0. StatSoft Inc., Tulsa, OK, versão demonstração por 30 dias. Disponível em www.statsoft.com. Consultado em 6/04/2014.

Terés, S., Barcelo-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., & Escribá, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13811-13816.

Trujillo, I., Ojeda, M. A., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., & Diez, C. M. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10(1), 141-155.

Tsimidou, M. Z., Georgiou, A., Koidis, A., & Boskou, D. (2005). Loss of stability of “veiled”(cloudy) virgin olive oils in storage. *Food chemistry*, 93(3), 377-383.

UNESCO (2010). Representative List of the intangible cultural Heritage of Humanity. Disponível em <http://www.unesco.org/culture/ich/doc/src/17331-EN.pdf>. Consultado em 20/05/2014.

Venol (2014) Disponível em <http://www.venol.gr/2/1/company/> Consultado em 08/07/2014.

Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., ... & Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (< i> Olea europaea</ i> L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89(4), 561-568.

Vossen, P. (2007). Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience*, 42(5), 1093-1100.

Wong, M. L., Timms, R. E., & Goh, E. M. (1988). Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65(2), 258-261.

ANEXO A

MINUTA DO PROTOCOLO DE COLABORAÇÃO COM OS FORNECEDORES DAS AMOSTRAS

Protocolo de Colaboração

Entre a Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior C.R.L., CESEM, e a Empresa _____, relativo à monitorização de parâmetros do azeite, desde a sua produção e ao longo do seu armazenamento, com vista à caracterização da sua qualidade.

(I)

A CESEM, fundada em 1987, localizada no município de Almada, tem um perfil de dedicação exclusiva à área das ciências da saúde, apresentando actualmente licenciaturas, mestrados e pós-graduações (www.egasmoniz.edu.pt).

(II)

A Empresa _____, fundada em __, propriedade de _____, localizada em ____ é produtora de azeite (monovarietal da espécie ____ /mistura das espécies ____).

(III)

A CESEM pretende monitorizar alguns dos parâmetros indicadores da qualidade do azeite, como por exemplo o índice de peróxidos, o teor de aldeídos e o de clorofila, por um período mínimo de 12 meses a partir da sua produção, em várias condições de armazenamento.

Prevê-se que o referido trabalho terá aplicação académica e comercial. A aplicação académica traduzir-se-á numa dissertação de mestrado da licenciada Liliana Serrano, sob a orientação da Doutora Zilda Morais, e, provavelmente, numa publicação em revista científica. A aplicação comercial será definida pela empresa _____, podendo ser, por exemplo, a incorporação dos resultados no rótulo do seu produto.

Assim, é estipulado e reciprocamente aceite o presente protocolo que se rege pelas seguintes **cláusulas**.

Cláusula 1ª

Tendo em vista o objectivo declarado em (III), a CESEM e a empresa _____ comprometem-se a realizar as acções necessárias à viabilização da investigação respectiva.

Cláusula 2ª

A Empresa _____ compromete-se a:

1. Informar atempadamente a mestranda Liliana Serrano sobre a data de início do processamento das azeitonas;
2. Disponibilizar o acesso às suas instalações para a recolha de amostras;
3. Fornecer gratuitamente as amostras de azeite nas quantidades necessárias para os ensaios;

Cláusula 3ª

O armazenamento e as análises ao azeite decorrerão nas instalações do Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, CiiEM, no Monte da Caparica. A CESEM suportará os custos da investigação.

Cláusula 4ª

Concluído o projecto, a CESEM dará conhecimento dos resultados obtidos à empresa _____, assim como dos métodos analíticos utilizados.

Cláusula 5ª

Os direitos de autor da investigação são propriedade da CESEM e dos investigadores envolvidos.

Cláusula 6ª

No caso da empresa _____ pretender utilizar os resultados da investigação, só poderá fazê-lo se arcar com os custos referentes à sua obtenção, nomeadamente o custo das análises, as deslocações e o alojamento, se for caso disso.

Cláusula 7ª

O presente protocolo é lavrado em duplicado e vai ser assinado pelos representantes abaixo mencionados, ficando um exemplar na posse de cada um dos outorgantes.

Monte da Caparica, Outubro de 2012

O representante da Cooperativa Egas Moniz
Prof Doutor José Martins dos Santos

O representante da empresa _____
Nome _____

ANEXO B

RELATÓRIOS DE ENSAIO INSA- ÍNDICE DE PERÓXIDOS


GOVERNO DE PORTUGAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.
 Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa Portugal | <http://www.insa.pt> | info@insa.min-saude.pt
 tel. +351 217 519 200 fax. +351 217 220 400

Instituto Nacional de Saúde
 Doutor Ricardo Jorge

Departamento Alimentação e Nutrição
 Unidade Referência
 Laboratório Química

dan@insa.min-saude.pt | tel. +351 217 519 346 | fax. +351 217 508 153

Relatório de Ensaio - Análise Química

Nº Requisição: 185643
 Nº Amostra: 290686
 Data de entrada: 25/10/2013
 Início dos ensaios: 25/10/2013
 Fim dos ensaios: 25/10/2013

Requisitante: Egas Moniz - Coop. de Ensino Superior, CRL
Morada: Campus Universitário, Quinta da Granja
Código Postal: 2829-511 CAPARICA

Amostra

Descrição: Azeite - Amostra A
Motivo do Pedido: A determinação abaixo indicada.
Acondicionamento: Em tubo de plástico de 50 ml, fechado com tampa de plástico protegida com papel parafim. O tubo e a tampa estavam identificados, respectivamente, com as inscrições manuscritas: "A" e "Corredor; 5A1".
Observações: A amostra foi entregue pelo Requisitante.
 O conteúdo total da amostra foi homogeneizado, constituindo-se a amostra analítica a que corresponde o resultado exarado neste Relatório.

Resultados

Parâmetro	Método	Valor	Unidade
Índice de peróxido em gorduras e óleos comestíveis	NP EN ISO 3960:2004	19	mEq O2/kg

Interpretação dos resultados

Observações

X1= 19,4 mEqO2/Kg; X2= 19,2 mEqO2/Kg; X3= 18,5 mEqO2/Kg

Desvio padrão = 0,5 mEqO2/Kg

O presente Relatório de Ensaio anula e substitui o anteriormente emitido em 05/11/2013, referente a Nº Requisição: 185643 e Nº Amostra: 290686.

Data de saída: 08/11/2013

Mariana Santos

Mariana Ramos Santos
Responsável Técnico


GOVERNO DE PORTUGAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.
 Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa Portugal | <http://www.insa.pt> | info@insa.min-saude.pt
 tel. +351 217 519 200 fax. +351 217 220 400

Instituto Nacional de Saúde
 Doutor Ricardo Jorge

Departamento Alimentação e Nutrição
 Unidade Referência
 Laboratório Química

dan@insa.min-saude.pt | tel. +351 217 519 346 | fax. +351 217 508 153

Relatório de Ensaio - Análise Química

Nº Requisição: 185643
 Nº Amostra: 290691
 Data de entrada: 25/10/2013
 Início dos ensaios: 25/10/2013
 Fim dos ensaios: 25/10/2013

Requisitante: Egas Moniz - Coop. de Ensino Superior, CRL
Morada: Campus Universitário, Quinta da Granja
Código Postal: 2829-511 CAPARICA

Amostra

Descrição: Azeite - Amostra B
Motivo do Pedido: A determinação abaixo indicada.
Acondicionamento: Em tubo de plástico de 50 ml, fechado com tampa de plástico protegida por papel parafim. O tubo e a tampa estavam identificados, respectivamente, com as inscrições manuscritas: "B" e "Corredor; 6G2".
Observações: A amostra foi entregue pelo Requisitante.
 O conteúdo total da amostra foi homogeneizado, constituindo-se a amostra analítica a que corresponde o resultado exarado neste Relatório.

Resultados

Parâmetro	Método	Valor	Unidade
Índice de peróxido em gorduras e óleos comestíveis	NP EN ISO 3960:2004	22	mEq O2/kg

Interpretação dos resultados

Observações

X1= 22,0 mEqO2/Kg; X2= 22,1 mEqO2/Kg; X3= 22,7 mEqO2/Kg

Desvio padrão = 0,4 mEqO2/Kg

O presente Relatório de Ensaio anula e substitui o anteriormente emitido em 05/11/2013, referente a Nº Requisição: 185643 e Nº Amostra: 290691.

Data de saída: 08/11/2013

Mariana Santos

Mariana Ramos Santos
Responsável Técnico



Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.
 Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa P o r t u g a l http://www.insa.pt info@insa.min-saude.pt
 tel. +351 217 519 200 fax. +351 217 520 400

Instituto Nacional de Saúde
 Doutor Ricardo Jorge



Departamento Alimentação e Nutrição
 Unidade Referência
 Laboratório Química dan@insa.min-saude.pt

tel. +351 217 519 346 fax. +351 217 508 153

Relatório de Ensaio - Análise Química

Nº Requisição: 185643
 Nº Amostra: 290695
 Data de entrada: 25/10/2013
 Início dos ensaios: 25/10/2013
 Fim dos ensaios: 25/10/2013

Requisitante: Egas Moniz - Coop. de Ensino Superior, CRL
 Morada: Campus Universitário, Quinta da Granja
 Código Postal: 2829-511 CAPARICA

Amostra

Descrição: Azeite - Amostra C
 Motivo do Pedido: A determinação abaixo indicada.
 Acondicionamento: Em tubo de plástico de 50 ml, envolvido em papel de alumínio, fechado com tampa de plástico protegida por papel parafim. O tubo e a tampa estavam identificados, respectivamente, com as inscrições manuscritas: "C" e "FeLA; 5A1".
 Observações: A amostra foi entregue pelo Requisitante.
 O conteúdo total da amostra foi homogeneizado, constituindo-se a amostra analítica a que corresponde o resultado exarado neste Relatório.

Resultados

Parâmetro	Método	Valor	Unidade
Índice de peróxido em gorduras e óleos comestíveis	NP EN ISO 3960:2004	17	mEq O ₂ /kg

Interpretação dos resultados

Observações

X1= 16,9 mEqO₂/Kg; X2= 17,0 mEqO₂/Kg; X3 = 17,1 mEqO₂/Kg

Desvio padrão = 0,1mEqO₂/Kg

O presente Relatório de Ensaio anula e substitui o anteriormente emitido em 05/11/2013, referente a Nº Requisição: 185643 e Nº Amostra: 290695.

Data de saída: 08/11/2013

Mariana Santos

Mariana Ramos Santos
 Responsável Técnico



Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P.
 Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa P o r t u g a l http://www.insa.pt info@insa.min-saude.pt
 tel. +351 217 519 200 fax. +351 217 520 400

Instituto Nacional de Saúde
 Doutor Ricardo Jorge



Departamento Alimentação e Nutrição
 Unidade Referência
 Laboratório Química dan@insa.min-saude.pt

tel. +351 217 519 346 fax. +351 217 508 153

Relatório de Ensaio - Análise Química

Nº Requisição: 185643
 Nº Amostra: 290696
 Data de entrada: 25/10/2013
 Início dos ensaios: 25/10/2013
 Fim dos ensaios: 25/10/2013

Requisitante: Egas Moniz - Coop. de Ensino Superior, CRL
 Morada: Campus Universitário, Quinta da Granja
 Código Postal: 2829-511 CAPARICA

Amostra

Descrição: Azeite - Amostra D
 Motivo do Pedido: A determinação abaixo indicada.
 Acondicionamento: Em tubo de plástico de 50 ml, envolvido em papel de alumínio, fechado com tampa de plástico protegida por papel parafim. O tubo e a tampa estavam identificados, respectivamente, com as inscrições manuscritas: "D" e "FeLA; 6G2".
 Observações: A amostra foi entregue pelo Requisitante.
 O conteúdo total da amostra foi homogeneizado, constituindo-se a amostra analítica a que corresponde o resultado exarado neste Relatório.

Resultados

Parâmetro	Método	Valor	Unidade
Índice de peróxido em gorduras e óleos comestíveis	NP EN ISO 3960:2004	11	mEq O ₂ /kg

Interpretação dos resultados

Observações

X1= 11,5 mEqO₂/Kg; X2= 11,2 mEqO₂/Kg; X3 = 11,6 mEqO₂/Kg

Desvio padrão = 0,3 mEqO₂/Kg

O presente Relatório de Ensaio anula e substitui o anteriormente emitido em 05/11/2013, referente a Nº Requisição: 185643 e Nº Amostra: 290696.

Data de saída: 08/11/2013

Mariana Santos

Mariana Ramos Santos
 Responsável Técnico

ANEXO C

RESULTADOS GERAIS

Resultados gerais do índice de anisidina

Amos tra	4°C						FELA						FILA						FILN					
	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses
1M	14,3	11,7	13,2	10,8	12,7	11,6	12,0	12,3	13,4	12,5	12,8	9,9	11,7	13,7	12,1	12,5	15,0	12,5	12,9	12,7	10,6	16,5	15,0	4,1
2C	10,8	8,3	11,0	9,9	11,6	9,9	10,8	9,6	13,1	10,3	7,0	6,7	10,3	10,0	8,3	10,3	13,5	8,6	10,5	11,8	10,8	12,2	13,5	5,1
3P	5,6	5,4	5,7	7,2	5,0	4,9	5,3	3,5	6,4	4,9	2,4	4,2	5,4	5,1	3,8	6,0	6,4	7,9	5,6	8,0	5,4	5,7	6,4	3,6
4M	8,3	7,5	8,4	4,8	7,3	8,7	4,2	5,7	8,5	8,4	7,3	6,2	8,2	7,3	8,2	8,6	7,5	5,5	8,0	8,6	10,9	8,9	7,5	7,8
5A	3,5	4,3	2,8	4,0	4,1	3,5	4,6	3,4	3,2	2,6	2,6	4,7	2,8	1,9	2,3	3,2	3,1	5,7	1,4	3,3	3,9	3,1	3,1	1,4
5P	4,4	4,7	6,0	4,0	5,0	5,8	4,5	4,0	6,3	4,7	6,6	5,0	5,7	4,6	5,6	4,8	2,8	7,6	3,2	6,4	5,5	4,9	2,8	4,2
6D	7,4	3,8	7,7	6,6	7,8	4,7	7,4	14,2	7,6	7,4	6,5	4,4	7,3	6,7	7,0	4,8	6,1	6,8	8,8	6,8	10,5	8,5	6,1	6,4
6M	6,0	6,3	9,4	5,2	5,6	4,7	5,2	4,3	4,8	4,1	4,5	2,6	5,5	4,8	8,1	4,8	5,0	4,9	5,2	1,1	7,3	7,8	5,0	4,2
6G	4,0	7,4	6,0	3,7	4,6	3,3	3,8	3,4	3,2	4,1	3,5	4,3	4,1	3,0	3,8	2,3	4,4	3,3	2,9	5,4	6,3	4,2	4,4	2,9
7M	6,5	2,8	7,6	6,0	9,0	5,9	7,2	5,5	6,6	8,6	7,0	6,7	6,4	8,4	7,3	5,9	14,6	10,5	6,9	3,8	10,7	5,3	8,0	2,5

Resultados gerais de clorofila (mg/kg)

Amostra	4°C						FELA						FILA						FILN
	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	10 meses	12 meses	2 meses
1M	12,43	12,33	12,85	12,95	11,36	15,49	12,44	13,45	12,69	12,87	13,01	14,20	12,45	12,86	12,72	12,56	12,22	11,51	8,51
2C	2,80	3,09	2,92	2,91	2,83	2,99	2,39	2,90	2,96	2,81	2,75	3,08	2,29	3,70	2,89	2,62	2,71	2,61	0,35
3P	11,12	11,10	11,27	11,69	10,94	11,80	10,64	11,08	11,08	11,15	11,02	9,40	10,70	10,53	10,91	11,07	11,02	10,73	7,30
4M	7,27	7,05	6,81	6,95	7,10	7,32	6,14	6,71	6,55	6,63	6,64	5,63	6,02	6,59	6,29	6,28	6,26	6,32	3,69
5A	6,12	6,09	5,98	6,36	5,68	5,72	5,36	5,81	5,38	5,47	5,35	5,10	5,17	5,55	5,08	4,98	5,12	5,06	1,84
5P	4,75	5,31	5,07	3,45	4,98	5,11	4,56	5,03	4,96	4,87	4,91	4,97	4,48	5,12	4,81	4,83	4,90	4,68	3,16
6D	11,58	11,60	11,58	11,84	11,59	10,81	11,05	9,39	11,46	11,80	12,05	10,68	11,03	11,77	11,39	11,39	11,52	11,25	9,62
6M	9,31	9,60	9,73	10,70	9,91	9,77	9,02	10,51	7,69	10,20	10,23	11,25	9,04	5,84	9,51	9,45	9,61	9,42	7,69
6G	8,16	8,35	8,09	8,26	8,28	8,42	7,72	10,30	8,00	9,00	8,50	7,83	7,52	8,07	8,33	7,96	7,96	7,06	6,24
7M	4,25	4,82	4,48	4,88	4,66	4,58	3,98	4,48	6,31	4,48	4,40	3,94	3,83	4,01	4,34	5,82	4,26	4,36	1,77

Resultados gerais de índice de acidez (g/100g ácido oleico)

Evolução do índice de acidez após 12 meses de armazenamento das amostras na condição 4°C e FILN

Amostra	t = 12meses 4°C	t = 12 meses FILN
	Média dos duplicados (g/100g ácido oleico)	
1M 1	0,3	0,3
1M2	0,2	0,2
1M3	0,2	0,4
2C1	0,1	0,2
2C2	0,1	0,2
2C3	0,2	0,2
3P1	0,3	0,4
3P2	0,3	0,5
3P3	0,3	0,5
4M1	0,3	0,5
4M2	0,3	0,3
4M3	0,3	0,4
5A1	0,2	0,1
5A2	0,1	0,1
5A3	0,1	0,2
5P1	0,1	0,1
5P2	0,1	0,2
5P3	0,2	0,2
6D1	0,3	0,3
6D2	0,2	0,2
6D3	0,3	0,4
6M1	0,3	0,3
6M2	0,4	0,2
6M3	0,5	0,9
6G1	0,4	0,4
6G2	0,5	0,4
6G3	0,5	0,7
7M1	0,6	0,5
7M2	0,5	0,6
7M3	0,6	0,6

Amostra	t = 12 meses 4°C	t = 12 meses FILN
	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$
1 M	0,2±0,03	0,3±0,07
2C	0,1±0,03	0,2±0,03
3P	0,3 ±0,005	0,4±0,07
4M	0,3±0,02	0,4±0,10
5A	0,1±0,04	0,2±0,01
5P	0,2±0,05	0,2±0,06
6D	0,3±0,04	0,3±0,06
6M	0,4±0,12	0,5±0,34
6G	0,5±0,05	0,5±0,12
7M	0,6±0,05	0,6±0,02

ANEXO D

ANÁLISE SENSORIAL DO AZEITE - REGULAMENTO CE-640/2008

O Azeite é o único produto com prova organoléptica obrigatória. As suas características organolépticas são definidas através de um painel de provadores especializados para o efeito. Estas são sensações detectáveis pelos sentidos, fundamentalmente relacionadas com o cheiro e sabor. Uma vez que a cor de um Azeite não caracteriza a sua qualidade, os provadores profissionais utilizam copos de vidro de cor azul, para não se deixarem influenciar pela sua tonalidade. O azeite é aquecido a uma temperatura de, aproximadamente, 28° C de modo a que os componentes voláteis que conferem o cheiro e o sabor ao azeite se libertem mais facilmente. Assim, pode-se encontrar nos azeites dois tipos de sensações: positivas e negativas.

Atributos / Sensações Positivas

Entre os atributos que podem definir um Azeite, encontram-se os seguintes:

Frutado - conjunto das sensações olfactivas dependentes da variedade de azeitona por via directa e/ou retronasal, características dos azeites provenientes de frutos sãos e frescos, verdes ou maduros. Ao atributo Frutado associa-se o qualitativo Verde quando as sensações olfactivas lembram as de frutos verdes, características do verde proveniente de frutos verdes; e o qualitativo Maduro quando as sensações olfactivas lembram as de frutos maduros, características do azeite proveniente de frutos verdes e maduros.

Amargo - gosto elementar característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação, sentido pelas papilas caliciformes que constituem o V lingual. Pode ser mais ou menos agradável em função da sua intensidade.

Picante - sensação táctil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, características dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.

Para além destes atributos podem ainda ser identificados outros aromas e sabores tais como:

Amêndoa - “flavour” que pode surgir com duas formas diferentes: uma típica da amêndoa verde, a outra característica da amêndoa seca e sã que pode ser confundida com um princípio de ranço.

Maçã - “flavour” característico do Azeite que lembra o da maçã.

Doce - sabor agradável do Azeite sem ser propriamente açucarado, no qual não predominam os atributos amargo, adstringente e picante.

Erva - “flavour” característico de certos Azeites, que lembra o da erva recentemente ceifada.

Folha verde - “flavour” característico do Azeite obtido a partir de azeitonas demasiado verdes ou que foram moídas juntamente com folhas e troncos.

Apagado ou extinto - “flavour” do Azeite cujas características organolépticas são muito ténues, devido à perda dos seus constituintes aromáticos.

Defeitos / Sensações Negativas

Os defeitos organolépticos que ocorrem nos Azeites, caso não sejam seguidas todas as boas práticas de fabrico são, entre outros:

Tulha/Borra - “flavour” característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocam num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contacto, nos depósitos e reservatórios, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.

Mofa/húmido - “flavour” característico dos azeites obtido de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições húmidas.

Avinhado-avinagrado - “flavour” característico de certos azeites que lembra o vinho ou o vinagre. Deve-se, fundamentalmente, a um processo fermentativo aeróbio das azeitonas ou de restos de pasta de azeitonas em capachos que não foram lavados correctamente, que leva a formação de ácido acético, acetato de etilo e etanol.

Metálico - "flavour" que lembra os metais e é característico dos azeites que permaneceram prolongadamente em contacto com superfícies metálicas durante os processos de trituração, maxalagem prensagem e armazenagem.

Ranço - “flavour” dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso.

Terra - "flavour" dos azeites obtidos de azeitonas colhidas com terra ou lamacentas e não lavada.