

Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes

Patrícia Alexandra Ferreira Mendes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Mestre Ricardo Manuel da Silva Malheiro

**Bragança
2012**

Trabalho realizado no âmbito do Projeto:

“Table olives from the northeast of Portugal: Contribution for their characterization and promotion”. Financiado pelo International Olivet Oil Council.

*Á minha mãe e Irmã
Ao Pedro*

Agradecimentos

Ao entregar esta Dissertação de Mestrado, é com enorme satisfação que agradeço a todos que de, forma direta ou indireta, colaboraram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária, pela constante atenção, apoio, disponibilidade e ajuda, que sempre demonstrou ao longo da realização do trabalho laboratorial e escrito.

Ao meu co-orientador, Mestre Ricardo Manuel da Silva Malheiro, da Escola Superior Agrária, que com a sua cordial atenção, disponibilidade e amizade me ajudou e orientou, pelos seus conhecimentos laboratoriais e escritos transmitidos, sugestões e críticas concedidas para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Professor Doutor Albino Bento da Escola Superior Agrária, pela simpatia e esforço para garantir condições materiais e financeiras para o bom desenvolvimento deste trabalho.

À Anabela e ao Ivo, por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos, pela ajuda, simpatia e boa disposição que sempre demonstraram na execução da parte experimental deste trabalho. Agradeço também ao Eric.

À Dona Isabel, por todo auxílio técnico prestado no laboratório.

Ao Nuno, pelo seu companheirismo, ajuda, amizade e boa disposição.

Às minhas amigas Filipa e Vanessa, por dividirmos e somarmos as dificuldades na conquista de mais esta etapa, pela amizade, dedicação, diversão e alegria que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Raquel, que mesmo estando longe, agradeço todo o apoio, amizade e paciência.

Aos meus amigos de longa data, Bárbara, Catarina e Paulo, pela amizade, carinho, apoio e por todos os bons momentos de diversão e alegria.

Ao meu namorado e melhor amigo, Pedro, que sempre me auxiliou em todas as dificuldades, pela sua constante ajuda, paciência, compreensão, amizade, incentivo e apoio demonstrado no percurso deste trabalho. Pelo seu carinho e amor destes anos.

Por fim, mas muito importante, agradeço a toda a minha família. À minha mãe por todos os esforços que fez para que eu chegasse até aqui e pela sua preciosa compreensão e amor. À minha irmã por todos os conselhos transmitidos, preocupação, amizade e apoio. Aos meus pequenos afilhados, Maria Leonor e Rodrigo, pelos seus sorrisos e bons momentos passados juntos, que sempre me animaram. Aos meus avós.

Ao meu pai, que onde estiver, esteve sempre a olhar por mim

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| <i>Capítulo 1 - Introdução e Objetivos</i> | 1 |
| <i>Capítulo 2 - Caracterização das Azeitonas de Mesa</i> | 7 |
| 2.1- Definição de “Azeitonas de mesa” | 9 |
| 2.2- Classificação das Azeitonas | 9 |
| 2.3- Tipos de preparações | 12 |
| 2.4- Composição em compostos fenólicos | 18 |
| 2.5- Fatores que influenciam a composição em compostos fenólicos..... | 21 |
| 2.5.1- Cultivar..... | 22 |
| 2.5.2- Processamento tecnológico | 24 |
| 2.5.3- Estado de maturação..... | 27 |
| 2.6- Atividade Biológica | 28 |
| 2.6.1- Atividade antioxidante | 28 |
| 2.6.2- Atividade antimicrobiana | 31 |
| <i>Capítulo 3 - Material e Métodos</i> | 33 |
| 3.1- Caracterização das amostras e amostragem | 35 |
| 3.2- Preparação dos extratos aquosos | 37 |
| 3.3- Identificação e quantificação dos compostos fenólicos | 38 |
| 3.4- Atividade Antioxidante | 39 |
| 3.4.1- Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH | 39 |
| 3.4.2- Determinação do Poder Redutor | 40 |
| 3.5- Atividade Antimicrobiana | 40 |
| 3.5.1- Microrganismos utilizados e condições de cultura | 41 |
| 3.5.2- Ensaio preliminares da atividade antimicrobiana | 41 |
| 3.6- Análise Estatística | 42 |
| 3.6.1. Análise de regressão linear | 42 |
| 3.6.2. Análise de componentes principais | 42 |
| <i>Capítulo 4 - Resultados e Discussão</i> | 44 |
| 4.1- Identificação e quantificação dos compostos fenólicos | 46 |
| 4.2-Atividade antioxidante | 53 |
| 4.3- Atividade antimicrobiana | 58 |
| 4.4- Análise estatística..... | 63 |
| 4.4.1- Correlação entre a composição fenólica e a atividade antioxidante..... | 63 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2- Análise de componentes principais (ACP)..... | 66 |
| <i>Capítulo 5 - Conclusão</i> | 68 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação dos tipos de azeitonas de mesa, pelo seu estado de maturação, processamento e forma de apresentação..... | 10 |
| Tabela 2: Principais classes de compostos fenólicos identificados em azeitonas | 21 |
| Tabela 3: Caracterização detalhada das amostras em estudo. | 37 |
| Tabela 4: Perfil fenólico, expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$, das amostras em estudo (média \pm desvio padrão; $n = 2$)..... | 50 |
| Tabela 5: Rendimento de extração e valores de EC_{50} das amostras de azeitonas de mesa estudadas..... | 54 |
| Tabela 6: Atividade antimicrobiana dos extratos das azeitonas de mesa testados. | 61 |
| Tabela 7: Correlação entre os compostos fenólicos e a respetiva atividade antioxidante das azeitonas de mesa transmontanas..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Evolução da produção e consumo de azeitonas de mesa em Portugal nos últimos dez anos. Adaptado a partir dos dados do COI (2011)..... | 5 |
| Figura 2: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o método de fermentação natural. | 13 |
| Figura 3: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o Estilo Sevilhano ou Espanhol. | 14 |
| Figura 4: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o Estilo Californiano ou Americano. | 17 |
| Figura 5: Área geográfica dos concelhos de Trás-os-Montes onde se recolheram as amostras de azeitonas de mesa. | 35 |
| Figura 6: Exemplo de azeitonas verdes, mistas e pretas ao natural recolhidas na região de Trás-os-Montes. | 36 |
| Figura 7: Exemplo da suspensão do microrganismo <i>B. cereus</i> contendo aproximadamente 10 ⁶ ufc/mL..... | 42 |
| Figura 8: Cromatograma (HPLC) do perfil fenólico de azeitonas de mesa transmontanas. Deteção a 280 nm, 320 nm e 350 nm: (1) hidroxitirosol glicol; (2) hidroxitirosol; (3) tirosol; (4) ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico; (5) derivado de verbascosídeo; (6) verbascosídeo; (7) luteolina 7- <i>O</i> -glucósido; (8) rutina; (9) apigenina 7- <i>O</i> -glucósido; (10) apigenina..... | 47 |
| Figura 9: Estrutura química dos compostos fenólicos identificados nos extratos de azeitonas de mesa de Trás-os-Montes: (1) hidroxitirosol glicol; (2) hidroxitirosol; (3) tirosol; (4) ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico; (6) verbascosídeo; (7) luteolina 7- <i>O</i> -glucósido; (8) rutina; (9) apigenina 7- <i>O</i> -glucósido; (10) apigenina. | 48 |
| Figura 10: Poder redutor dos extractos provenientes das amostras 16, 18 e 22..... | 55 |
| Figura 11: Efeito bloqueador do radical DPPH, em percentagem, dos extratos das amostras 16, 18 e 22. | 56 |
| Figura 12: Atividade antimicrobiana dos extratos das amostras 21 (A), 8 (B) e 7 (C), nas diferentes concentrações testadas..... | 59 |
| Figura 13: Exemplo da atividade antimicrobiana do extrato 21, sobre o crescimento da bactéria Gram + (<i>B. cereus</i>) nas maiores e menores concentrações de inibição (12,5 e 100 mg/mL). | 60 |

Figura 14: Análise de componentes principais usando o perfil em compostos fenólicos, teor em fenóis totais e valores de EC_{50} registados na atividade antioxidante de 24 amostras de azeitonas de mesa de fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes. As componentes principais explicam 64,42% da variância total dos dados. Hid. Glicol = hidroxitirosol glicol; A7Ogl = apigenina 7-O-glucósido; A5OCq = ácido 5-O-cafeoilquinico; PR = poder redutor. 66

RESUMO

A azeitona de mesa tem uma grande tradição em Portugal e principalmente na região de Trás-os-Montes.

Neste sentido, com o presente trabalho pretendeu-se contribuir para a caracterização da fração fenólica e atividade biológica das azeitonas de mesa provenientes da região de Trás-os-Montes. Procedendo em primeiro lugar à análise da composição fenólica por cromatografia líquida de alta performance com detetor de díodos (HPLC/DAD), e em segundo avaliar a atividade biológica (atividade antioxidante e atividade antimicrobiana) de extratos de 24 amostras de azeitonas de mesa transmontanas, pertencentes às cultivares Cobrançosa e Negrinha de Freixo, processadas segundo o método de fermentação natural.

Na caracterização do perfil fenólico, foram identificados e quantificados 10 compostos fenólicos, nomeadamente, hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol, tirosol, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, derivado de verbascosídeo, verbascosídeo, luteolina 7-*O*-glucósido, rutina, apigenina 7-*O*-glucósido e apigenina, tendo sido o hidroxitirosol glicol e o hidroxitirosol os compostos mais abundantes. O teor em compostos fenólicos totais variou entre 2,37 e 64,17 µg/mg de extrato.

Na avaliação da atividade antioxidante, pelos métodos do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e poder redutor, os valores de EC₅₀ estiveram compreendidos entre 0,13 mg de extrato/mL de solução a 0,83 mg/mL para o ensaio do DPPH, e entre 0,30 mg/mL a 1,66 mg/mL para o poder redutor, sendo as amostras com maior teor em fenóis totais mais ativas. Verificou-se que apenas uma amostra não alcançou o valor de EC₅₀, tendo apenas obtido o valor de EC₂₅, relatando valores de 1,85 e 2,67 mg/ml (para DPPH e poder redutor, respetivamente).

Quando se estabeleceram correlações entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antioxidante registada, verificou-se que o hidroxitirosol glicol, o hidroxitirosol, o verbascosídeo e seu derivado, bem como o teor em compostos fenólicos totais foram os que mais contribuíram para um maior potencial antioxidante, apresentando correlações negativas extremamente significativas ($P \leq 0,001$). Com os mesmos dados foi possível separar as amostras em três grupos de acordo com o seu potencial antioxidante aplicando uma análise de componentes principais, corroborando

esta os dados obtidos até então relacionados com o perfil fenólico e atividade antioxidante.

A atividade antimicrobiana foi testada com bactérias Gram-positivo (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), onde também foram avaliadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI mg/mL). Foram analisados seis extratos (amostras 7, 8, 12, 13, 21, e 22) que revelaram inibição no crescimento quer das bactérias Gram + como das Gram -, com a exceção da bactéria *E. coli* para as amostras 7, 12 e 13.

Do presente estudo conclui-se que as azeitonas de mesa obtidas por fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes são uma rica fonte de compostos fenólicos com relevante importância bioativa, uma vez que revelaram um significativo potencial antioxidante e atividade contra microrganismos patogénicos para o Homem.

Palavras-chaves: azeitonas de mesa; fermentação natural; composição fenólica; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Table olives are a tradition in Portugal and mainly in Trás-os-Montes region.

In this sense, with the presented work it was intended to contribute for the characterization of the phenolic fraction and biological activity of table olives from Trás-os-Montes region. In first place the phenolic composition of the table olives was assessed by high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC/DAD), and then biological activity was evaluated (antioxidant and antimicrobial activity) in 24 extracts of table olives from Trás-os-Montes, belonging to olive cultivars Cobrançosa and Negrinha de Freixo, processed following the natural fermentation methodology.

In the phenolic characterization of the different table olives samples, were identified and quantified 10 phenolic compounds, namely, hydroxytyrosol glycol, hydroxytyrosol, tyrosol, 5-*O*-caffeoylquinic acid, verbascoside derivate, verbascoside, luteolin 7-*O*-glucoside, rutin, apigenin 7-*O*-glucoside and apigenin, being hydroxytyrosol glycol and hydroxytyrosol the most abundant compounds. Total phenols content varied between 2.37 and 64.17 µg/mg of extract.

In the antioxidant activity, assayed by the methods of scavenging capacity on the DPPH free radicals and reducing power, EC₅₀ values varied between 0.13 and 0.83 mg of extract/mL of solution in the DPPH method, and between 0.30 and 1.66 mg/mL in the reducing power, being more active those samples with higher total phenols content. It was verified that only in one sample the EC₅₀ value wasn't reached, being only obtained the EC₂₅ value, reporting 1.85 and 2.67 mg/mL (for DPPH and reducing power, respectively).

When correlations were performed between phenolic composition and total phenols content with the recorded in the antioxidant activity, it was verified that hydroxytyrosol glycol, hydroxytyrosol, and verbascoside and its derivate, as well as total phenols content contributed for a higher antioxidant potential, being obtained extremely negative significant correlations ($P \leq 0,001$). With the same data it was possible to separate the table olives samples in three main groups according to their

antioxidant activity by applying a principal component analysis, corroborating the data obtained in the phenolic composition and antioxidant activity.

The antimicrobial activity was tested with Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), where were also evaluated the minimum inhibitory concentrations (MIC mg/mL). Six extracts were analyzed (samples 7, 8, 12, 13, 21, and 22) which showed growth inhibition against Gram + as well against Gram -, with the exception of *E. coli* in samples 7, 12 and 13.

From the present study it is concluded that table olives from Trás-os-Montes obtained from natural fermentation are a rich source of phenolic compounds with relevant bioactive importance, once they revealed a significant antioxidant potential and activity against pathogenic microorganisms to man. Among the results obtained, olive cultivar, olives harvest time, and the crop year could be preponderant aspects and may explain the variability observed in the data.

Keywords: table olives; natural fermentation; phenolic composition; antioxidant activity; antimicrobial activity.



Capítulo 1

Introdução e Objetivos

A azeitona é um fruto proveniente da oliveira que pertence à família *Oleaceae*, espécie *Olea europaea* L., que depois de processada é um importante ingrediente da dieta mediterrânica.

Botanicamente, a azeitona é uma drupa ovalada, porém difere dos outros tipos de drupas face à sua composição, visto que contém um menor teor em açúcar e um maior teor em óleo (Hammami *et al.*, 2011; Charoenprasert & Mitchell, 2012). Este fruto possui um tamanho típico de 2-3 cm de largura e comprimento, é constituído por 3 partes, o epicarpo ou pele, o mesocarpo ou polpa e o endocarpo ou caroço. A composição média da azeitona inclui água (50%), proteína (1,6%), gordura (22%), hidratos de carbono (19,1%), celulose (5,8%), substâncias inorgânicas (1,5%) e compostos fenólicos (1-3%) (Ghanbari *et al.*, 2012). Contudo, na composição das azeitonas podem ocorrer pequenas oscilações, que dependem essencialmente da variedade, condições culturais e estado de maturação do fruto (Bianchi, 2003)

Para as azeitonas se tornarem comestíveis é necessário que ocorram um conjunto de alterações físico-químicas que reduzam ou eliminem parcialmente o amargor que é característico dos frutos frescos, pois raramente são usadas e/ou consumidas na sua forma natural. Para tal, existem alguns processos de preparação que permitem uma manutenção quer nas propriedades nutricionais, quer nas propriedades físicas e químicas do fruto (Parinos *et al.*, 2007; Rejano *et al.*, 2010).

Assim, existem diversos processos tecnológicos, para a preparação de azeitonas de mesa, com o intuito de remover o amargor das azeitonas não processadas, que se deve maioritariamente ao composto fenólico oleuropeína (Aponte *et al.*, 2010). Os principais processos utilizados são o método de fermentação natural, as azeitonas verdes (estilo Espanhol ou Sevilhano) e as azeitonas pretas oxidadas (estilo Californiano ou Americano), que serão descritos mais à frente. É de salientar que a fermentação natural das azeitonas é o processo mais comum e ainda o mais utilizado na região de Trás-os-Montes, para a preparação e/ou produção de azeitonas de mesa.

Atualmente, o sector da olivicultura, tem assumido um papel de enorme importância em Portugal, estendendo-se por, aproximadamente 346 000 hectares de olival por todo o Continente (INE, 2011), sendo a cultura permanente com maior expressividade, com especial incidência na região do interior, nomeadamente em Trás-os-Montes.

As azeitonas de mesa são um produto cuja produção e consumo é amplamente verificado em todo o mundo. À escala mundial, a produção de azeitonas de mesa atingiu um elevado volume e representa uma parte substancial da economia de vários países.

No que respeita à produção de azeitonas de mesa em Portugal, segundo os dados disponíveis do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2011), indicam que o nosso país é o quarto maior produtor de azeitona de mesa da União Europeia, estando atrás da Espanha (maior produtor mundial), da Grécia e Itália. A produção média anual em Portugal nos últimos 10 anos rondou aproximadamente as 12 000 toneladas (Figura 1).

Relativamente, ao consumo deste produto, os dados disponíveis do COI indicam que na União Europeia, Portugal é o quinto país onde mais se consomem azeitonas de mesa, com um consumo previsto para o ano de 2011/2012 de cerca de 7 000 toneladas (COI, 2011). Os dados revelam também que Portugal teve um défice deste produto em anos anteriores, verificando-se um maior consumo face à produção obtida (Figura 1).

Nas últimas duas décadas tem-se verificado um crescimento progressivo na produção mundial de azeitonas de mesa, com uma produção prevista para este ano (campanha de 2011/2012) de cerca de 2 565 000 toneladas (COI, 2011).

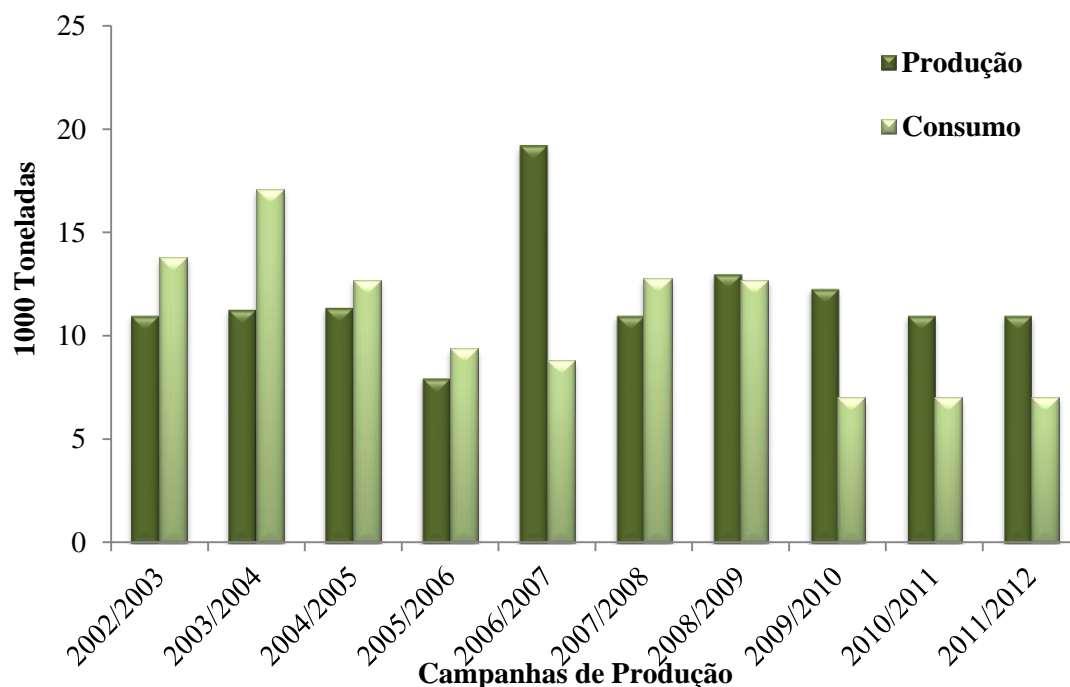
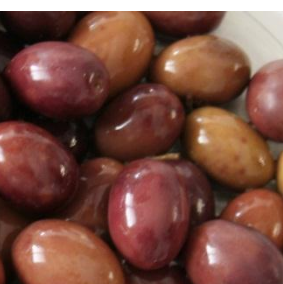


Figura 1: Evolução da produção e consumo de azeitonas de mesa em Portugal nos últimos dez anos. Adaptado a partir dos dados do COI (2011).

Embora, em Trás-os-Montes exista uma longa tradição associada à produção de azeitona de mesa, a informação existente acerca deste produto não é muito abundante. Neste sentido, com a realização do presente trabalho pretende-se contribuir para a caracterização de azeitonas de mesa produzidas artesanalmente na região transmontana, no que respeita à composição fenólica e à atividade antioxidante e capacidade antimicrobiana. Os objetivos específicos do trabalho são:

- Determinar qualitativamente e quantitativamente o perfil em compostos fenólicos por HPLC/DAD;
- Proceder à avaliação da atividade antioxidante de extratos preparados desse tipo de azeitonas;
- Avaliar a sua capacidade antimicrobiana sobre microrganismos patogénicos para o Homem;



2.1- Definição de “Azeitonas de mesa”

Segundo a Norma Portuguesa NP – 3034 (2012), atualmente em preparação, e o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004), entende-se por “Azeitonas de mesa”, o produto preparado a partir de frutos sãos da oliveira (*Olea europaea* L.), escolhidos para produzir, frutos cujo volume, a forma, a boa proporção de polpa em relação ao caroço e as características da polpa, nomeadamente, a firmeza da polpa, o sabor, a textura e facilidade de separação do caroço se tornam particularmente adequados para o seu processamento.

Ainda de acordo com as mesmas fontes, as azeitonas são submetidas a tratamentos tecnológicos para remover o amargor natural que possuem e preservadas por fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem conservantes e acondicionados com ou sem meio líquido, para assegurar a sua estabilidade e evitar a deterioração do produto final.

2.2- Classificação das Azeitonas

As azeitonas de mesa podem ser classificadas sobretudo de acordo com o seu estado de maturação, a sua forma de apresentação e ainda pelo processamento tecnológico a que foram submetidas.

No entanto a Norma Portuguesa NP – 3034 (2012) e o COI, que é a entidade que a nível internacional regula o sector dos azeites e da azeitona de mesa, apenas consideram três tipos de azeitona de mesa, dependendo do seu estado de maturação (Tabela 1). Pois as azeitonas podem apresentar distintas colorações, variando desde a cor verde ao negro-púrpura

Por sua vez, e ainda de acordo com a Norma Portuguesa NP – 3034 (2012) e o COI, as azeitonas de mesa podem também ser classificadas de acordo com o processamento tecnológico que lhe dá origem e quanto à sua forma de apresentação (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos tipos de azeitonas de mesa, pelo seu estado de maturação, processamento e forma de apresentação.

| Tipos de Azeitona | Classificação |
|---|---|
| Estado de maturação | |
| Azeitonas verdes | Obtidas a partir de frutos colhidos durante o período de amadurecimento, antes de terem a cor rosada, e que tenham atingido o tamanho normal. A cor do fruto poderá variar de verde a amarelo-palha. |
| Azeitonas mistas | Obtidas a partir de frutos colhidos antes de atingirem a completa maturação. A cor do fruto pode variar desde tons rosados, violáceos ou esverdeados. |
| Azeitonas pretas | Obtidas a partir de frutos colhidos completamente maduros ou ligeiramente antes. A cor do fruto pode variar de avermelhado-escuro a castanho – escuro, passando por tons violáceos. |
| Processamento | |
| Azeitonas curadas em salmoura | Inclui azeitonas verdes, mistas ou pretas, que são submetidas a um tratamento alcalino e embaladas em salmoura, onde ocorre uma fermentação completa ou parcial. A sua conservação subsequente pode ser assegurada por adição de agentes acidificantes, por esterilização ou pasteurização. |
| Azeitonas ao natural em salmoura | Inclui azeitonas verdes, mistas ou pretas, tratadas diretamente com salmoura, onde ocorre uma fermentação completa ou parcial, e conservadas ou não por acidificantes. |
| Azeitonas escurecidas por oxidação | Obtidas a partir de frutos que não atingiram a maturação completa e escurecidas mediante oxidação após o tratamento alcalino. Devem ser acondicionadas em salmoura e preservadas por esterilização. A sua cor preta é homogénea. |

| | |
|--|--|
| Azeitonas desidratas e/ou enrugadas | Inclui azeitonas verdes, mistas ou pretas, submetidas ou não a um ligeiro tratamento alcalino. Conservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas com sal seco e / ou por aquecimento ou qualquer outra aplicação de outro processo tecnológico. |
| Forma de apresentação | |
| <hr/> | |
| Azeitonas inteiras | Frutos com forma natural, não descaroçados, com ou sem pedúnculos. |
| Azeitonas britadas | Frutos submetidos a um processo mecânico em que a polpa é aberta sem quebrar o caroço, que permanece inteiro e intacto no interior do fruto. |
| Azeitonas descaroçadas | Frutos com forma praticamente natural, aos quais lhe foi retirado o caroço. |
| Azeitonas retalhadas | Frutos golpeados no sentido longitudinal por cortes na pele e parte da polpa. |
| Azeitonas em quartos | Frutos cortados em quatro partes aproximadamente iguais, após serem descaroçados. |
| Azeitonas em metades | Frutos descaroçados ou recheados, cortados em duas partes aproximadamente iguais, perpendicularmente ao maior eixo do fruto. |
| Azeitonas em rodelas | Frutos descaroçados ou recheados, cortados no sentido transversal em segmentos de espessura regularmente uniforme. |
| Azeitonas recheadas | Frutos descaroçados e com recheio de um ou mais ingredientes, nomeadamente, pimenta, cebola, amêndoas, aipo, anchovas, raspas de laranja ou de limão, avelãs, etc.. |
| Azeitonas recheadas em metades | Frutos recheados ou descaroçados, cortados em duas partes aproximadamente iguais. |
| Azeitonas recheadas em rodelas | Frutos recheados e cortados em fatias sensivelmente com a mesma espessura. |
| Pasta de azeitona | Somente polpa de azeitona triturada finamente, podendo ser adicionados outros ingredientes. |

2.3- Tipos de preparações

As azeitonas são um fruto que necessitam de sofrer um conjunto de modificações físico-químicas e microbiológicas, com o objetivo de as tornar edíveis, mantendo as características próprias do fruto e permitindo a sua conservação por um maior período de tempo (Bianchi, 2003). É necessário remover o amargor e o picante característico deste fruto fresco, que se deve maioritariamente à presença do composto fenólico oleuropeína (Gómez *et al.*, 2006; Ben Othman *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010). Assim, o processo de fermentação a que as azeitonas são sujeitas, vai promover modificações no aroma, no sabor e na qualidade do produto final, que se deve predominantemente à atividade das bactérias lácticas e leveduras presentes no decorrer da fermentação (Bautista-Gallego *et al.*, 2011).

De entre os inúmeros processamentos tecnológicos conhecidos, destacam-se três, pela sua distinção a nível internacional: azeitonas de fermentação natural, azeitonas verdes (estilo Espanhol ou Sevilhano) e as azeitonas pretas oxidadas (estilo Californiano ou Americano).

Nas azeitonas de **Fermentação natural**, os frutos são colhidos independentemente do seu estado de maturação (Panagou *et al.*, 2011; Charoenprasert & Mitchell, 2012), quando tenham atingido o seu tamanho normal e com uma textura que seja razoavelmente firme, para a realização deste processamento (Figura 2). Depois da colheita as azeitonas são transportadas para uma unidade fabril, onde são escolhidas, separando os frutos danificados e os de menor tamanho. Posteriormente, as azeitonas são lavadas com água para remover a sujidade superficial (Fernández *et al.*, 1997; Tassou *et al.*, 2002) e são diretamente colocadas em salmoura com uma concentração de sal (NaCl) a variar entre 8% a 10% (Tassou *et al.*, 2002; Rejano *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011) ou ligeiramente inferior (6%) em zonas de produção mais frias (Nychas *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006).

De seguida inicia-se o processo de fermentação "espontânea", conduzida maioritariamente por leveduras (Nout & Rombouts, 2000; Oliveira *et al.*, 2004; Piga *et al.*, 2005; Aponte *et al.*, 2010), mas também por uma microflora de bactérias Gram negativas e bactérias lácticas (Fernández *et al.*, 1997; Nout & Rombouts, 2000; Tassou *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006; Aponte *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011).

O processo de fermentação é considerado um processo lento, e só é dado como terminado quando os compostos fermentáveis (principalmente açúcares) se difundem através da pele da azeitona para o exterior (Cardoso *et al.*, 2010) e quando ocorre a solubilização da oleuropeína na salmoura, depois de pelo menos oito meses (Gómez *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010). É de salientar que a hidrólise do composto oleuropeína pode ser catalisada quimicamente, tal como, pelo pH ácido que se verifica no processo de fermentação, ou também pela atividade de enzimas, por exemplo a enzima β -glucosidase (Psani & Kotzekidou, 2006; Gutierrez-Rosales *et al.*, 2010; Charoenprasert & Mitchell, 2012).

Após a fermentação, as azeitonas pretas podem ser oxidadas por exposição ao ar, para ocorrer uma melhoria na sua cor (Gómez *et al.*, 2006), sendo uma fase desnecessária para as azeitonas mistas. Esta etapa de exposição ao ar, não deve exceder mais de 48 horas, para evitar o enrugamento superficial das azeitonas por desidratação (Gómez *et al.*, 2006). Por fim, as azeitonas podem ser classificadas por tamanho e embaladas numa nova salmoura para posterior comercialização (Fernández *et al.*, 1997).

O produto final mantém ainda um sabor ligeiramente amargo, devido essencialmente à presença de polifenóis residuais (Panagou *et al.*, 2011).

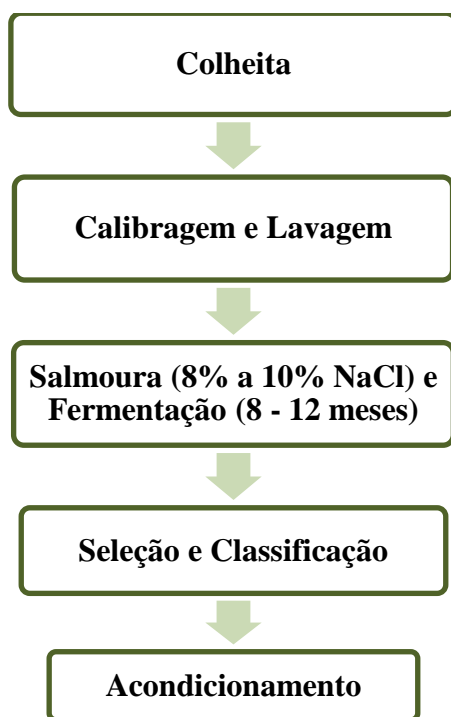


Figura 2: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o método de fermentação natural.

É de salientar, que a preparação de produtos vegetais fermentados depende, essencialmente, da utilização do sal (NaCl) comum, como o ingrediente principal da salmoura, porque reduz a atividade da água, aumenta a força iónica da solução, reduz a solubilidade do oxigénio na água, inibe a deterioração indesejável e microflora patogénica, garantindo assim a segurança microbiológica do produto final durante o armazenamento (Panagou *et al.*, 2011).

Assim, de acordo com o estado de maturação inicial das azeitonas para este processo de fermentação natural, podem originar azeitonas verdes ao natural, quando as azeitonas que lhe deram origem são colhidas no seu estado de maturação inicial, azeitonas mistas ao natural quando o seu grau de maturação não é tão homogéneo ou azeitonas pretas ao natural, quando as azeitonas que lhe deram origem são colhidas num grau de maturação mais avançado.

As **azeitonas verdes**, também são designadas azeitonas verdes curadas em salmoura e/ou azeitonas verdes **Estilo Sevilhano ou Espanhol**, cujo diagrama de fluxo para o presente método de processamento de azeitona está descrito na Figura 3.

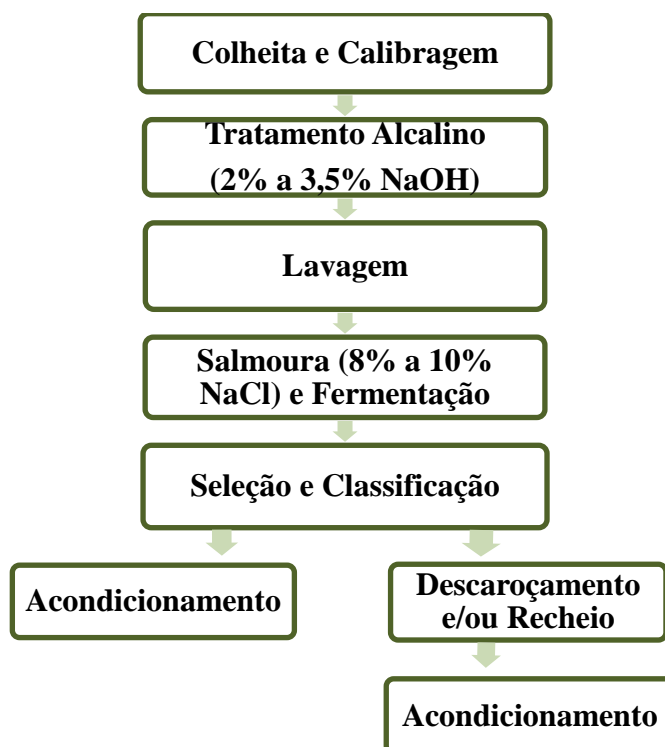


Figura 3: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o Estilo Sevilhano ou Espanhol.

Para este processamento as azeitonas são cuidadosamente colhidas quando apresentam uma cor verde ou amarelo-palha mas tendo atingido o tamanho normal (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Após a colheita, procede-se ao transporte das azeitonas para a unidade de processamento, onde os frutos são escolhidos e calibrados, e submetidos a um tratamento anaeróbio com hidróxido de sódio (NaOH), a variar de 2% a 3,5% (NaOH em água, p/v), para remover quimicamente o amargor característico do fruto fresco (Panagou & Katsaboxakis, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008; Rejano *et al.*, 2010). No entanto, a concentração de NaOH adequada depende de vários fatores, nomeadamente, a temperatura, a cultivar, o grau de maturação dos frutos no momento da colheita (Fernández *et al.*, 1997; Charoenprasert & Mitchell, 2012). Normalmente, este tratamento tem a duração de algumas horas, de modo que a solução de NaOH atinja cerca de dois terços da polpa (Parinos *et al.*, 2007).

As azeitonas são posteriormente lavadas repetidamente com água, para eliminar a solução alcalina (De Castro & Brenes, 2001; Montañó *et al.*, 2003; Panagou & Katsaboxakis, 2006). Durante este passo é removida parte da oleuropeína e os seus produtos de hidrólise, bem como, outros polifenóis e açúcares fermentáveis (Fernández *et al.*, 1997; De Castro & Brenes, 2001).

Após lavagem, os frutos são colocados em salmoura, contendo uma concentração de NaCl de aproximadamente 10%, momento a partir do qual se inicia o processo fermentação láctica (Fernández *et al.*, 1997; Nout & Rombouts, 2000; Gómez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012).

No processo de fermentação láctica podem ser reconhecidas quatro fases distintas, que são caracterizadas essencialmente pelo crescimento de diferentes microrganismos. (Fernández *et al.*, 1997; Montañó *et al.*, 2003). Inicialmente, as bactérias Gram negativas, frequentemente membros da família *Enterobacteriaceae*, são o grupo dominante da primeira fase da fermentação (Fernández *et al.*, 1997; Panagou & Katsaboxakis, 2006; Bautista-Gallego *et al.*, 2011), mas estas desaparecem progressivamente quando o pH da salmoura diminui, como consequência do seu próprio metabolismo (Rejano *et al.*, 2010). De fato, a produção de ácido por estes microrganismos incentiva o crescimento de *Lactobacillus*, sobretudo *Lactobacillus plantarum*, tornando-se o grupo de microrganismos dominantes no final da fermentação (Rejano *et al.*, 2010).

A presença de *L. plantarum* na fermentação é essencial para proporcionar a quantidade de ácido láctico necessário para a conservação, bem como para o aroma característico das azeitonas (Vega Leal-Sánchez *et al.*, 2003). Na última fase, a principal espécie presente é a *Propionibacterium*. Esta quarta fase só se inicia quando a maioria dos substratos fermentáveis terminam, levando à formação do ácido propiónico e do ácido acético à custa do ácido láctico, verificando-se o decréscimo do ácido láctico e conseqüentemente um ligeiro aumento do pH (Montaño *et al.*, 2003).

É de salientar que o período de duração da fermentação depende, essencialmente, das características do tratamento alcalino, da cultivar, da temperatura e da população microbiana presente (Fernández *et al.*, 1997).

Por fim, as azeitonas são selecionadas e classificadas por tamanhos para serem seguidamente embaladas. Este tipo de azeitonas pode ser comercializado com diferentes apresentações, desde inteiras, descaroçadas ou recheadas com um ou diversos ingredientes (Gómez *et al.*, 2006) podendo ou não ocorrer uma pasteurização para garantir a preservação do produto (Fernández *et al.*, 1997; Charoenprasert & Mitchell, 2012).

Nas **azeitonas pretas oxidadas**, ou também conhecidas **por Estilo Californiano ou Americano**, cujo diagrama de fluxo para este processamento de azeitona está descrito na Figura 4, os frutos são colhidos quando a sua cor está a começar a mudar, antes de atingir a sua plena maturação (Rejano *et al.*, 2010). Após a colheita e seleção as azeitonas podem ser diretamente submetidas a processamento, ou serem conservadas por vários meses (2 a 6 meses) sob condições anaeróbias numa salmoura com uma concentração de NaCl entre os 5-10%, ocorrendo a fermentação, sobretudo devido ao crescimento de leveduras (Bianchi, 2003; Gómez *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006).

Em geral, as azeitonas são submetidas a tratamentos contínuos, entre dois a cinco tratamentos, com soluções de NaOH (hidróxido de sódio entre 1% a 2%), por períodos de tempo variável, de modo que se consiga uma penetração progressiva da solução de NaOH desde a polpa até ao caroço (Fernández *et al.*, 1997; Rejano *et al.*, 2010). Entre cada tratamento, as azeitonas são suspensas em água intensamente arejadas por ar injetado, de modo a oxidar uniformemente as azeitonas (Arroyo-López *et al.*, 2010).

Quanto se alcançar a cor desejada, as azeitonas continuam a ser lavadas para remover o excesso de NaOH, e baixar o pH da polpa, aproximadamente um pH=8 (Marsilio *et al.*, 2001; Bianchi, 2003; Gómez *et al.*, 2006). Para estabilizar e manter a

cor obtida na oxidação é adicionado à última água de lavagem, 0,1% de gluconato ferroso (Rejano *et al.*, 2010), com uma duração de aproximadamente 24 horas, embora a difusão do ferro na polpa possa estar completa após 10 horas de contacto (Gómez *et al.*, 2006).

Por fim, as azeitonas são escolhidas, calibradas e embaladas numa salmoura contendo um teor NaCl entre 1% a 3% e com valores de pH entre 5,8 e 7,9 (Rejano *et al.*, 2010), podendo ser acondicionadas e comercializadas com diferentes formas de apresentação, como sejam, inteiras, descaroçadas e/ou cortadas em fatias (Gómez *et al.*, 2006). É ainda possível garantir a sua conservação através do processo de esterilização (Marsilio *et al.*, 2001; Ghanbari *et al.*, 2012), de modo a impedir o crescimento de microrganismos patogénicos.

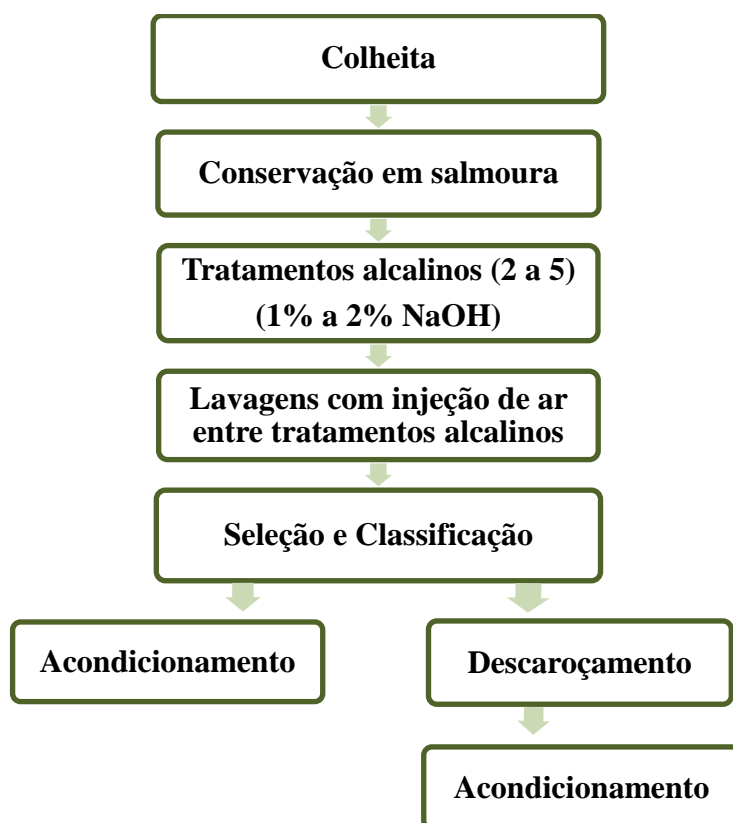


Figura 4: Fluxograma do processamento de preparação de azeitonas de mesa segundo o Estilo Californiano ou Americano.

2.4- Composição em compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em todas as plantas, sendo produzidos pelo metabolismo secundário, no entanto a sua concentração e natureza dependem em grande parte da espécie (Ryan *et al.*, 2002; Morelló *et al.*, 2004). Desempenham várias funções importantes, como sejam, uma melhor adaptação e/ou interação ao meio ambiente e participarem em processos responsáveis pela cor, sabor e adstringência em vários alimentos (Soares, 2002; Rodríguez *et al.*, 2009b). São conhecidos como uma dádiva da natureza e representam uma das classes mais abundantes dos produtos vegetais naturais, pois para além das suas funções biológicas, ainda estão presentes em produtos alimentares e em matérias agrícolas e florestais (Bondet, 2007).

Os compostos fenólicos, antioxidantes naturais, caracterizam-se por possuírem atividade antioxidante (Savarese *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Karaosmanoglu *et al.*, 2010), podendo esta atividade ser tão ou mais eficiente do que a atividade de outros antioxidantes, nomeadamente, as vitaminas C e E, e o β -caroteno (Arantes, 2008).

Por essa razão é que os compostos fenólicos têm ganho um interesse crescente, devido aos seus benefícios para a saúde do Homem, uma vez que podem contribuir para a redução do *stress* oxidativo diminuindo a probabilidade de ocorrência de doenças degenerativas (Owen *et al.*, 2003), como sejam, o cancro, a diabetes, doenças inflamatórias e cardiovasculares (Rodríguez *et al.*, 2009b). Estes compostos possuem também propriedades farmacológicas (Esti *et al.*, 1998; Savarese *et al.*, 2007) e demonstram ter atividade antimicrobiana, podendo constituir uma alternativa aos antibióticos e conservantes químicos (Pereira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008).

Os produtos e subprodutos da oliveira, principalmente as azeitonas, têm sido alvo de volume significativo de investigação. As azeitonas são um fruto que possui um complexo perfil fenólico, uma vez que os dados relatados indicam quantidades apreciáveis de compostos fenólicos (Cardoso *et al.*, 2005), com um papel muito importante nas suas propriedades químicas, organolépticas e nutricionais (Rodríguez *et al.*, 2008; Ben Othman *et al.*, 2009). Em geral, a localização dos compostos fenólicos nas azeitonas encontra-se sobretudo na pele e em redor do caroço (endocarpo) (Charoenprasert & Mitchell, 2012).

Os polifenóis ou fenóis livres e os seus glucósidos representam 1 a 3% do peso da azeitona fresca e as classes mais importantes de compostos fenólicos presentes na

azeitona, incluem os álcoois fenólicos, os secoiridóides, os flavonóides e os ácidos fenólicos (Owen *et al.*, 2000; Vinha *et al.*, 2005; Tokuşođlu *et al.*, 2010; Charoenprasert & Mitchell, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012). No entanto, os principais polifenóis presentes nas azeitonas não processadas são o secoiridoide oleuropeína, o hidroxitirosol e tirosol (Conde *et al.*, 2008).

Os compostos hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) e o tirosol (*p*-hidroxifeniletanol) pertencem à classe dos álcoois fenólicos (Romero *et al.*, 2002a), sendo os compostos mais abundantes presentes em azeitonas de mesa e azeite (Tripoli *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009a). O hidroxitirosol é produzido a partir da hidrólise da oleuropeína, enquanto que o tirosol é um produto formado por hidrólise do ligstrosídeo (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Estes são alguns dos compostos fenólicos que contribuem para a adstringência da azeitona e conferem resistência à oxidação quer em azeites quer em azeitonas de mesa (Singh *et al.*, 2006).

O teor em tirosol e hidroxitirosol aumenta durante a maturação da azeitona (Boskou *et al.*, 2006), sendo o último o composto maioritário presente nas azeitonas mais maduras (Romero *et al.*, 2002a). É de salientar que o nível de hidroxitirosol em azeitonas processadas pode ser considerado elevado com um valor aproximado de 4 g/kg (peso seco) (Charoenprasert & Mitchell, 2012).

No que respeita à classe dos secoiridóides, os compostos mais comuns são a oleuropeína, o ligstrosídeo e a demetiloleuropeína. A oleuropeína é um éster que é constituída por hidroxitirosol e ácido elenólico, por outro lado o ligstrosídeo é um éster que é composto por tirosol e ácido elenólico (Charoenprasert & Mitchell, 2012).

A oleuropeína é o principal secoiridóide presente nas azeitonas verdes, e contribui significativamente para o amargor característico da azeitona (Romero *et al.*, 2004a; Silva *et al.*, 2006). Este composto apresenta aproximadamente um teor de 14% do peso seco das azeitonas verdes, contudo, durante a maturação do fruto sofre hidrólise (Silva *et al.*, 2006), e sua concentração diminui (Boskou *et al.*, 2006). Caso a oleuropeína sofra uma quebra da ligação éster dará origem a hidroxitirosol e oleosido 11-metil ester, enquanto se houver uma quebra da ligação glicosídica, formar-se-ão oleuropeína aglicona e glucose (Manna *et al.*, 2004; Charoenprasert & Mitchell, 2012), daí haver uma redução da adstringência do fruto, uma vez que estes compostos formados não possuem essa característica, exceptuando a oleuropeína aglicona.

De acordo com trabalhos publicados, alguns derivados do composto fenólico oleuropeína têm sido identificados em cultivares portuguesas sobretudo o ácido

elenólico, demetiloleuropeína e oleuropeína aglicona (Vinha *et al.*, 2005). No entanto, o composto demetiloleuropeína pode ser indicado como um marcador químico, uma vez que não está presente nas azeitonas de todas as cultivares de oliveira (Charoenprasert & Mitchell, 2012).

A presença do composto fenólico verbascosídeo em azeitonas, tem sido mencionado como sendo um derivado do ácido hidroxicinâmico (Blekas *et al.*, 2002; Ghanbari *et al.*, 2012).

A incidência dos compostos fenólicos, oleuropeína, demetiloleuropeína e verbascosídeo têm sido relatados como estando presente em todas as partes da azeitona, mas em maior abundância na polpa (Tripoli *et al.*, 2005).

Outra classe importante dos compostos fenólicos são os flavonóides, que constituem o grupo mais comum de compostos polifenólicos na dieta humana, com mais de 1600 tipos (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Nas azeitonas de mesa, os flavonóides mais representativos são a luteolina 7-*O*-glucósido, a rutina, a apigenina 7-*O*-glucósido, a luteolina e as antocianinas, cianidina 3-*O*-glucósido e cianidina 3-*O*-rutinósido (Blekas *et al.*, 2002; Ghanbari *et al.*, 2012) (Tabela 2).

Os ácidos fenólicos são as formas mais simples de compostos fenólicos na azeitona (Soares, 2002). Estes compostos podem ser divididos em ácido hidroxibenzóico, que inclui o ácido siríngico, o ácido vanílico e o ácido gálico, e em ácido hidroxicinâmico que compreende o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico (Ghanbari *et al.*, 2012). De entre, a diversa gama de ácidos fenólicos mencionados, os encontrados em níveis consideráveis em azeitonas não processadas, foram o ácido cafeico e o ácido *p*-cumárico (Blekas *et al.*, 2002)

Em suma, na tabela 2, são apresentados alguns compostos fenólicos que foram identificados, de uma maneira geral nas azeitonas, contudo os perfis fenólicos das azeitonas podem variar qualitativa e quantitativamente, dependendo de diversos fatores (ver ponto 2.5).

Tabela 2 Principais classes de compostos fenólicos identificados em azeitonas. ^a

| Compostos fenólicos | |
|---------------------------------------|---|
| Álcoois fenólicos | Hidroxitirosol (3,4 dihidroxifeniletanol) |
| | Tirosol (<i>p</i> - hidroxifeniletanol) |
| Flavonóides | Rutina |
| | Luteolina 5-glucósido |
| | Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido |
| | Apigenina 7- <i>O</i> -glucósido |
| Ácidos fenólicos | Ácido clorogénico |
| | Ácido cafeico |
| | Ácido protocatecuico |
| | Ácido vanílico |
| | Ácido ferúlico |
| | Ácido benzóico |
| | Ácido cinâmico |
| | Ácido gálico |
| Secoiridoides | Ácido <i>p</i> -cumárico |
| | Oleuropeína |
| | Demetiloleuropeína |
| Derivado ácido Hidroxicinâmico | Verbascosídeo |

^a (Adaptado a Ghanbari *et al.*, 2012)

2.5- Fatores que influenciam a composição em compostos fenólicos

As azeitonas são um fruto com um perfil fenólico muito complexo, que varia quer em qualidade quer em quantidade (Ben Othman *et al.*, 2009), uma vez que pode ser fortemente afetado por diversas variáveis intrínsecas e extrínsecas, sendo que os considerados mais importantes são a cultivar (Esti *et al.*, 1998; Brenes *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2004a; Vinha *et al.*, 2005), o tipo de processamento utilizado (Romero *et al.*, 2004a; Ben Othman *et al.*, 2009) e o grau de maturação dos frutos (Aponte *et al.*, 1986; Morrelló *et al.*, 2004; Conde *et al.*, 2008; Damak *et al.*, 2008).

2.5.1- Cultivar

Há alguns fatores particulares que podem afetar as próprias características físico-químicas das azeitonas pertencentes a diferentes cultivares, como sejam, o local de plantação, a idade da oliveira, as características edafoclimáticas, o ataque de pragas, os métodos de poda utilizados, o processo de colheita (mecânico ou manual) e estado de maturação do fruto (Fernández *et al.*, 1997; Bianchi, 2003). Ainda o facto de as cultivares serem importadas ou autóctones, influencia as propriedades físicas e químicas do fruto, uma vez que as cultivares autóctones têm uma melhor adaptação às condições ambientais locais (Fernández *et al.*, 1997).

Outro fator que pode influenciar o teor de compostos fenólicos é o estado de maturação da azeitona. Cultivares de maturação tardia podem ser responsáveis pela presença da oleuropeína nas azeitonas no momento da colheita e conseqüentemente estar prevista a sua presença nas azeitonas de mesa, no momento do consumo. Tal facto verificou-se na análise de azeitonas de mesa do tipo “alcaparras”, onde foi identificado e quantificado, embora em quantidades vestigiais, a oleuropeína (Malheiro *et al.*, 2011), numa cultivar de maturação tardia, a Cv. Verdeal Transmontana.

Assim sendo, os frutos pertencentes a diferentes cultivares, apresentam diferenças consideráveis, quer na sua morfologia, quer na sua composição química, o que remete para que alguns produtores de azeitonas tenham o conhecimento de quais as cultivares que são mais adequadas para a produção de azeitonas de mesa, enquanto outras são mais usadas para a produção de azeite (Vinha *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm sido feitos no sentido de verificar quais os compostos fenólicos identificados e quantificados em diferentes cultivares, uma vez que a expressão de compostos fenólicos nas azeitonas é predominantemente conduzida por fatores genéticos, levando a existir grandes diferenças na concentração de fenóis entre cultivares (Charoenprasert & Mitchell, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012).

Ao analisar a concentração de compostos fenólicos individuais em cultivares Gregas, Italianas, Portuguesas e Espanholas, os níveis de hidroxitirosol e seus derivados em azeitonas frescas maduras adequadas para a produção de azeitonas de mesa foram diferentes, a variar de 100 a 430 mg/kg e 3670 a 5610 mg/kg, respetivamente, e o teor do tirosol e tirosol 1-*O*-glucósido a variar de 30 a 160 mg/kg e de 170-260 mg/kg, respetivamente, mostrando a variabilidade destes compostos entre cultivares (Blekas *et al.*, 2002).

Sivakumar *et al.* (2005) ao estudarem a composição fenólica na polpa de azeitonas em três cultivares Italianas (Cassanese, Coratina e Carolea), revelaram que a cultivar Coratina continha um maior teor de oleuropeína (14,6 mg/kg), comparativamente com as restantes.

Também em cultivares Portuguesas foram estudados os compostos fenólicos presentes na polpa de azeitonas por Vinha *et al.* (2005). Estes autores verificaram que as concentrações destes compostos, essencialmente os compostos mais abundantes entre amostras, variaram consideravelmente entre cultivares, nomeadamente, o teor em oleuropeína a variar de 388 a 21681 mg/kg (peso fresco) e os níveis de hidroxitirosol compreendidos entre 397 a 71354 mg/kg. Ao comparar o conteúdo de oleuropeína obtido por Vinha *et al.* (2005), face a outros trabalhos publicados, os valores são superiores comparativamente com as cultivares Italianas relatadas por Esti *et al.* (1998), mas um menor teor para cultivares Francesas referido por Amiot *et al.* (1986). A concentração do composto fenólico verbascosídeo mostrou igualmente diferenças entre as cultivares Portuguesas e as cultivares Italianas.

Romero *et al.* (2002b), ao estudarem a polpa de azeitona de três cultivares espanholas, também observaram diferenças na composição de compostos fenólicos. O hidroxitirosol-4- β -D-glucósido foi o composto fenólico predominante, com diferentes concentrações entre cultivares. Do mesmo modo, os níveis de oleuropeína e hidroxitirosol apresentaram igualmente diferenças nas cultivares estudadas, variando de 5 a 48 mmol/kg peso seco e de 4 a 17 peso mmol/kg de peso seco, respetivamente. O conteúdo de verbascosídeo também exibiu diferenças entre as cultivares, variando de 0,03 mmol/Kg de peso seco a 0,37 mmol/kg de peso seco. Entre as antocianinas identificadas, a cianidina 3-*O*-glucósido e cianidina 3-*O*-rutinósido foram as únicas detetadas em todas as cultivares estudadas

Malheiro *et al.* (2011) ao estudarem azeitonas de mesa do tipo "alcaparras" (azeitonas de mesa descaroçadas) de diferentes cultivares, verificaram distintos perfis fenólicos entre os onze compostos fenólicos identificados, nos quais os mais abundantes foram o hidroxitirosol, o tirosol e o verbascosídeo, embora a percentagem destes compostos variou dependendo da cultivar.

Esti *et al.* (1998), obtiveram um perfil fenólico com teores variáveis dependendo da cultivar, nomeadamente para os compostos rutina e luteolina 7-*O*-glucósido.

Em suma, o fator cultivar parece desempenhar um papel importante na composição fenólica das azeitonas, revelando que cada cultivar possui um perfil fenólico característico (Romero *et al.*, 2004a).

2.5.2- Processamento tecnológico

Durante o processamento tecnológico a que as azeitonas são sujeitas, podem ocorrer um conjunto de alterações que afetam as propriedades organolépticas e físico-químicas do fruto (Romero *et al.*, 2004a). Pois a azeitona tal como é colhida da árvore, não se encontra apta para ser consumida, sendo necessário que ocorram no fruto uma série de transformações, que levem à diminuição ou remoção total da adstringência características dos frutos frescos (Ciafardini *et al.*, 2005; Owen *et al.*, 2003; Parinos *et al.*, 2007). A presença do amargor deve-se essencialmente ao elevado teor em compostos fenólicos, maioritariamente a oleuropeína (Gómez *et al.*, 2006; Parinos *et al.*, 2007), composto que é reduzido e/ou eliminado após o processo de fermentação (Ben Othman *et al.*, 2009).

Os principais métodos de processamento, fermentação natural, estilo Espanhol ou Sevilhano e estilo Californiano ou Americano, são utilizados com o objetivo de remover o amargor das azeitonas, tornando-as edíveis. No entanto estes métodos não só afetam os teores de oleuropeína, mas também as concentrações dos outros compostos fenólicos presentes no produto final (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Daí a concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes nas azeitonas frescas diferirem bastante das azeitonas fermentadas e tratadas.

Em estudos realizados sobre a influência do processamento na composição fenólica das azeitonas, Marsilio *et al.* (2005) verificaram que em azeitonas da mesma cultivar em estados de maturação semelhantes quando sujeitas quer a fermentação natural quer a preparação de azeitonas estilo Sevilhano, ocorre uma perda no teor em compostos fenólicos totais. Estes autores registaram que em azeitonas frescas o teor em compostos fenólicos inicialmente era de 5138 mg/kg, e após 5 meses de fermentação, diminuíram para 2513 mg/kg em azeitonas processadas por fermentação natural, e 448 mg/kg, nas azeitonas de estilo Sevilhano.

Também Romero *et al.* (2004a) chegaram a conclusões semelhantes no que respeita à comparação entre azeitonas de fermentação natural e azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano).

Ben Othman *et al.* (2009) ao estudarem a evolução dos compostos fenólicos durante a fermentação espontânea e fermentação controlada de azeitonas da cultivar “Chétoui” em três graus de maturação distintos, verificaram que o composto fenólico oleuropeína, que foi o mais abundante nas azeitonas verdes frescas (266 mg/100g de peso seco), diminuiu após os processos de fermentação. Contudo, foi notório o aumento nos teores de hidroxitirosol, devido à hidrólise da oleuropeína, e do ácido cafeico formado pela degradação do composto verbascosídeo. É de salientar, que durante o período de fermentação espontânea e fermentação controlada (fermentação natural) ocorreu uma perda significativa de compostos fenólicos totais, essencialmente devido à difusão dos compostos para a salmoura (Ben Othman *et al.*, 2009).

A perda dos compostos fenólicos durante a fermentação é também devido, ao facto das azeitonas não terem sido sujeitas a qualquer tratamento químico antes de serem colocadas em salmoura (Cardoso *et al.*, 2010).

Também, ao analisar o processo de fermentação natural, Romero *et al.* (2004b) observaram que no início da fermentação das azeitonas pretas, os compostos fenólicos mais abundantes eram hidroxitirosol-4- β -glucósido, a oleuropeína, o hidroxitirosol, o tirosol e o verbascosídeo. Contudo, após um ano de fermentação natural, houve uma alteração nesta composição fenólica, sendo o hidroxitirosol o principal composto fenólico presente.

No processamento de azeitonas verdes, ou estilo Espanhol, também é notável a diminuição da concentração dos compostos fenólicos. Brenes *et al.* (1995) verificaram que o conteúdo de oleuropeína diminui durante o processamento, por hidrólise das suas formas glucosiladas com hidróxido de sódio (NaOH), originando o composto hidroxitirosol (De Castro & Brenes, 2001). Durante este processamento também levou à diminuição dos teores de alguns compostos fenólicos, nomeadamente, a rutina e luteolina 7-*O*-glucósido e o hidroxitirosol foi o composto mais abundante nas amostras (Brenes *et al.*, 1995).

Relativamente ao processamento de azeitonas pretas oxidadas (estilo Californiano), as azeitonas ao poderem ser conservadas antes do processamento por vários meses numa solução de salmoura, esta conservação em salmoura pode influenciar os níveis dos compostos fenólicos, nomeadamente, de oleuropeína (Charoenprasert &

Mitchell, 2012). Marsilio *et al.* (2001) em azeitonas após 4 meses de fermentação em salmoura, observaram que os níveis de oleuropeína diminuíram de 1650 para 10 mg/100g de peso seco, devido essencialmente, à atividade microbiana, a hidrólise ácida e/ou à difusão de oleuropeína e seus produtos de hidrólise para a salmoura.

Neste tipo de processamento, os tratamentos alcalinos aeróbios resultam num escurecimento dos frutos e conseqüentemente a um decréscimo dos compostos fenólicos, com perda de valor nutricional (Marsilio *et al.*, 2001). Os flavonóides (luteolina 7-*O*-glucósido e rutina) e o ácido vanílico que estavam presentes nas azeitonas frescas em baixas quantidades, desapareceram durante o processo de fermentação. Paralelamente, foi observado um aumento do composto tirosol e do hidroxitirosol, durante o processo fermentativo (Marsilio *et al.*, 2001). No entanto, a concentração de verbascosídeo é mais estável ao longo da fermentação em salmoura (Charoenprasert & Mitchell, 2012).

Foi igualmente demonstrado, que as azeitonas pretas oxidadas possuem um menor conteúdo em compostos fenólicos, comparativamente com as azeitonas tratadas por fermentação natural (Romero *et al.*, 2004a). Assim, parece evidente que o método Californiano é o mais drástico para a concentração em compostos fenólicos.

Para além do tipo de processamento, Romero *et al.* (2004a) também demonstraram que a forma de apresentação das azeitonas afeta a composição fenólica, uma vez que, a concentração de polifenóis nas azeitonas recheadas foi menor do que nas azeitonas sem caroço.

Embora que nos diversos tipos de processamento se tenha verificado a eliminação ou remoção do composto oleuropeína, que se deve predominantemente á difusão para a salmoura, no entanto, também é devido à presença de bactérias lácticas que promovem a hidrólise das formas glucosiladas da oleuropeína através da enzima β -glucosidase, produzida pelo *Lactobacillus plantarum* (Ben Othman *et al.*, 2009). Por esse facto é que se verifica um aumento nos teores de hidroxitirosol em todos os processamentos, formado a partir da hidrólise da oleuropeína.

Assim, para preservar a qualidade das azeitonas de mesa, é necessário controlar o processamento tecnológico a utilizar, de forma a minimizar a perda de compostos fenólicos (Ben Othman *et al.*, 2009).

2.5.3- Estado de maturação

Com o avançar da maturação, as azeitonas exibem um conjunto de alterações, ao nível do tamanho, cor, textura, sabor e também na composição química. Este desenvolvimento do fruto é uma combinação de reações bioquímicas e fisiológicas que dependem das condições do ambiente e das características genéticas da cultivar (Morelló *et al.*, 2004; Conde *et al.*, 2008).

Durante a fase de maturação é necessário estimar o momento ótimo de colheita, pois é nesse período que a azeitona tem o perfeito equilíbrio, não só a nível nutricional, mas também apresenta uma maior concentração de fenóis totais, que se alteram drasticamente à medida que o estado de maturação progride (Conde *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos têm sido publicados, no sentido de verificar as alterações quantitativas e qualitativas que ocorrem no perfil fenólico da azeitona durante a maturação (Amiot *et al.*, 1986; Morelló *et al.*, 2004; Damak *et al.*, 2008), particularmente sobre as mudanças no teor de oleuropeína (Morelló *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2006).

No desenvolvimento da azeitona, são normalmente identificadas três fases, uma primeira fase de crescimento, durante a qual ocorre a acumulação do composto fenólico oleuropeína, podendo representar até 14% do peso seco das azeitonas (Ghanbari *et al.*, 2012). Outra fase é caracterizada pelo desenvolvimento onde ocorre uma redução nos níveis de clorofilas e da oleuropeína, e por fim, a fase de maturação que é caracterizada pelo aparecimento de antocianinas (Omar, 2010), ou seja, estas sofrem uma mudança de cor verde para negro-púrpura, que é consequência do aumento das antocianinas, principalmente cianidina 3-*O*-glucósido e cianidina 3-*O*-rutinósido (Romero *et al.*, 2004b; Vinha *et al.*, 2005). Ainda, nesta última fase de maturação verifica-se o aparecimento de flavonóides, luteolina 7-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-rutinósido, sendo estes os mais abundantes na polpa de azeitona madura (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Os níveis de oleuropeína continuam a diminuir (Omar, 2010), verificando-se a sua ausência em algumas azeitonas, principalmente em azeitonas pretas (Bianchi, 2003). A redução da concentração de oleuropeína é acompanhada pelo aumento dos seus derivados, a demetiloleuropeína e glucósido do ácido elenólico (Ghanbari *et al.*, 2012).

Ben Othman *et al.* (2009) ao analisarem azeitonas de mesa em três estados de maturação distintos, verificaram que as azeitonas verdes revelaram um maior conteúdo fenólico total (652 mg/100g de peso seco), seguido das azeitonas mistas (384 mg/100g

de peso seco) e depois as azeitonas pretas (311 mg/100g de peso seco). Confirmando que o teor em fenóis totais dependente do estado de maturação, que diminuem com o desenvolvimento da azeitona (Amiot *et al.*, 1986).

Em outro estudo realizado por Damak *et al.* (2008), verificaram igualmente que o teor de oleuropeína diminuiu à medida que progredia o período de maturação, sendo a sua concentração elevada em azeitonas verdes, com um teor de 17 e 8,18 g/kg, para a amostra colhida no início de Setembro e Outubro, respetivamente. Porém, a concentração de oleuropeína diminuiu progressivamente durante a maturação atingindo um teor de 7,45 g/kg em Fevereiro e 2,25 g/kg em Março do ano seguinte. Neste estudo, Damak *et al.* (2008) também verificaram que o hidroxitirosol foi o segundo composto fenólico mais abundante só que inesperadamente, a sua concentração diminuiu após a colheita.

No entanto, estudos anteriores sugerem que a concentração em hidroxitirosol aumenta com a maturação do fruto (Romero *et al.*, 2004b), tornando-se o hidroxitirosol o composto maioritário nas azeitonas pretas maduras (Romero *et al.*, 2004a). A concentração dos compostos verbascosídeo e tirosol também aumentam durante a maturação do fruto (Romero *et al.*, 2004b; Gómez-Rico *et al.*, 2008; Ben Othman *et al.*, 2009).

2.6- Atividade Biológica

As azeitonas de mesa são bem conhecidas pela sua fonte em compostos, nomeadamente compostos fenólicos, que detêm de propriedades biológicas muito importantes (Ryan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006; Savarese *et al.*, 2007), como sejam propriedades antioxidante (Owen *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006; Ben Othman *et al.*, 2009; Pereira-Caro *et al.*, 2009; Malheiro *et al.*, 2011) e antimicrobianas (Pereira *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007), entre outras.

2.6.1- Atividade antioxidante

Os antioxidantes são caracterizados como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de alguns substratos oxidáveis (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006), por inibição da formação de radicais livres e a eliminação de radicais importantes, através

da doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, levando à interrupção da reação em cadeia (Soares, 2002). Os radicais livres são produzidos, durante o metabolismo celular, na maior parte das vezes sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Bian & Jiang, 2009). As espécies reativas de oxigénio, quando presentes em baixas concentrações, podem ser benéficas para as células, estando envolvidas em algumas fisiopatologias humanas (Laguerre *et al.*, 2007). No entanto, pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de ROS e os antioxidantes, cujo esse desequilíbrio denomina-se *stress* oxidativo (Laguerre *et al.*, 2007).

Assim sendo, os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudam o corpo humano na redução dos danos oxidativos. Existem assim, alguns antioxidantes dietéticos naturais, que incluem as vitaminas E e C, os carotenoides e os compostos fenólicos (Huang *et al.*, 2005; Laguerre *et al.*, 2007).

No que respeita aos compostos fenólicos, estes são considerados antioxidantes naturais, pois são substâncias biologicamente ativas (Siger *et al.*, 2012), e estão em grande abundância na nossa dieta (Boskou *et al.*, 2006; Manach *et al.*, 2006). Os polifenóis têm recebido muita atenção da comunidade científica pelos seus efeitos biológicos, estando a sua actividade antioxidante associada à prevenção do *stress* oxidativo (Uccella, 2001; Huang *et al.*, 2005; Cardinali *et al.*, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012), menores riscos de alguns tipos de cancro e doenças coronárias (Simopoulos, 2001; Tapiero *et al.*, 2002), na modulação da atividade de algumas enzimas específicas, bem como no seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório (Tapiero *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2006). Na avaliação da capacidade antioxidante dos polifenóis, é verificada uma proteção na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e alterações oxidativas, devidas aos radicais livres e outras espécies reativas (Roche *et al.*, 2005; Boskou *et al.*, 2006).

Nesse sentido, nos últimos anos tem aumentado consideravelmente o interesse em antioxidantes naturais (Siger *et al.*, 2012), principalmente na indústria alimentar, que está a exigir novos e poderosos antioxidantes naturais com propriedades funcionais comprovadas para melhorar a qualidade nutricional dos géneros alimentícios. Assim, conduz a possibilidade de se reduzir, principalmente a nível industrial, o uso de antioxidantes sintéticos, por compostos antioxidantes de origem natural que são uma possível fonte alternativa de compostos bioativos (Laguerre *et al.*, 2007). A azeitona possui na sua composição uma fonte valiosa de compostos, como os carotenoides,

tocoferóis, flavonóides e compostos fenólicos (Savarese *et al.*, 2007), que estão entre os antioxidantes naturais mais estudados, com uma atividade biológica importante, que lhe confere propriedades antioxidantes (Ben Othman *et al.*, 2009).

Em estudos realizados acerca da atividade antioxidante das azeitonas de mesa, Owen *et al.* (2003) investigaram a capacidade antioxidante em dois tipos de azeitonas de mesa Italianas (preta e verde) tratadas em salmoura. Verificaram que as azeitonas verdes apresentaram um menor teor em compostos fenólicos, e conseqüentemente uma menor atividade antioxidante, quando comparada com as azeitonas pretas que revelaram concentrações mais elevadas de compostos fenólicos, nomeadamente, tirosol, hidroxitirosol e flavonóides (apigenina e luteolina), apresentando assim um maior potencial antioxidante.

Em azeitonas de mesa de cultivares portuguesas, processadas por diferentes processos tecnológicos, Pereira *et al.* (2006) verificaram que o processamento influi na atividade antioxidante. As azeitonas de mesa de fermentação natural apresentaram maior conteúdo em compostos fenólicos e maior atividade antioxidante, por outro lado as azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano) apresentaram menor teor em compostos fenólicos e respetivamente, um menor potencial antioxidante (Pereira *et al.*, 2006).

Também em cinco tipos de azeitonas de mesa Gregas, com diferentes estados de maturação, foi investigada a capacidade antioxidante por Boskou *et al.*, (2006). Estes autores verificaram que o conteúdo quantitativo e qualitativo em polifenóis variou consoante o tipo de azeitona de mesa, o que influenciou na atividade antioxidante.

No mesmo sentido, Sousa *et al.* (2008) e Malheiro *et al.* (2011), também avaliaram a atividade antioxidante das azeitonas de mesa do tipo “alcaparras” (azeitonas de mesa descaroçadas), onde verificaram que o processamento tecnológico, bem como as cultivares usadas influenciaram a atividade antioxidante das azeitonas de mesa.

Na avaliação dos processos de fermentação espontânea (fermentação natural) e fermentação controlada em azeitonas de mesa, Ben Othman *et al.* (2009) concluíram que o processamento influi no teor em compostos fenólicos e conseqüentemente no potencial antioxidante.

Embora, existam alguns trabalhos sobre a composição quantitativa e qualitativa dos compostos fenólicos nas azeitona de mesa (Romero *et al.*, 2002c; Pereira *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Malheiro *et al.*, 2011), não se conhece informação acerca das azeitonas de mesa Transmontanas. É de salientar que o potencial antioxidante das

azeitonas de mesa pode ser influenciado pelos processamentos tecnológicos utilizados na produção das azeitonas e pela cultivar, uma vez que há perda e/ou alteração do conteúdo em compostos fenólicos (Soler-Rivas *et al.*, 2000).

2.6.2- Atividade antimicrobiana

Para além da atividade antioxidante, vários estudos demonstraram a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos (Proestos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Malheiro *et al.*, 2012), podendo ser uma alternativa aos antibióticos e conservantes químicos (Oliveira *et al.*, 2008).

Nesse sentido, têm-se verificado um enorme interesse nos recursos antimicrobianos naturais (Medida *et al.*, 2007), devido, essencialmente, à pressão por parte do consumidor e à necessidade de se encontrar e/ou desenvolver novos agentes antimicrobianos, face ao aumento dos casos de resistência aos antibióticos (Sousa *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Também o elevado interesse nos compostos antimicrobianos naturais, está intimamente relacionado com a diminuição do uso expandido de medicamentos imunossupressores e do aumento nas infeções bacterianas (Paudel *et al.*, 2011).

Alguns relatos têm sido publicados sobre as propriedades antimicrobianas de produtos naturais, nomeadamente, da azeitona, que tem sido amplamente estudada, face aos compostos fenólicos que a constituem. Pois são componentes de grande importância, juntamente responsáveis não só pelas características físicas, mas também pela capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana (Malheiro *et al.*, 2011). Também, a atividade antimicrobiana de produtos e sub-produtos da oliveira tem sido estudada (Furneri *et al.*, 2002).

Em azeitonas de mesa portuguesas, Pereira *et al.* (2006) investigaram a atividade antimicrobiana presente nos extratos das azeitonas e verificaram que os extratos inibiam o crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

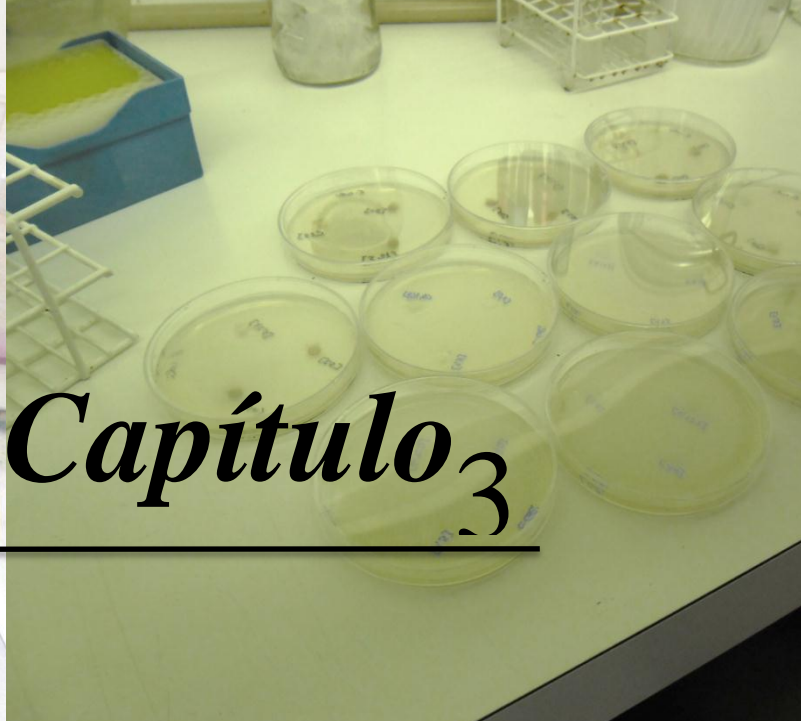
Em outros estudos incididos sobre a atividade antimicrobiana de azeitona de mesa do tipo “alcaparras” (azeitonas de mesa descaroadas), Sousa *et al.* (2006) observaram que os extratos deste tipo de azeitonas, também inibiam o crescimento dos microrganismos *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Faiza *et al.* (2011), estudaram a atividade antimicrobiana em azeitonas da Argélia, e verificaram que os extratos analisados demonstraram ter atividade antibacteriana e antifúngica contra bactérias patogênicas e fungos. No entanto, todos os extratos apresentaram bons efeitos inibidores em relação a *E. coli* e *B. cereus*.

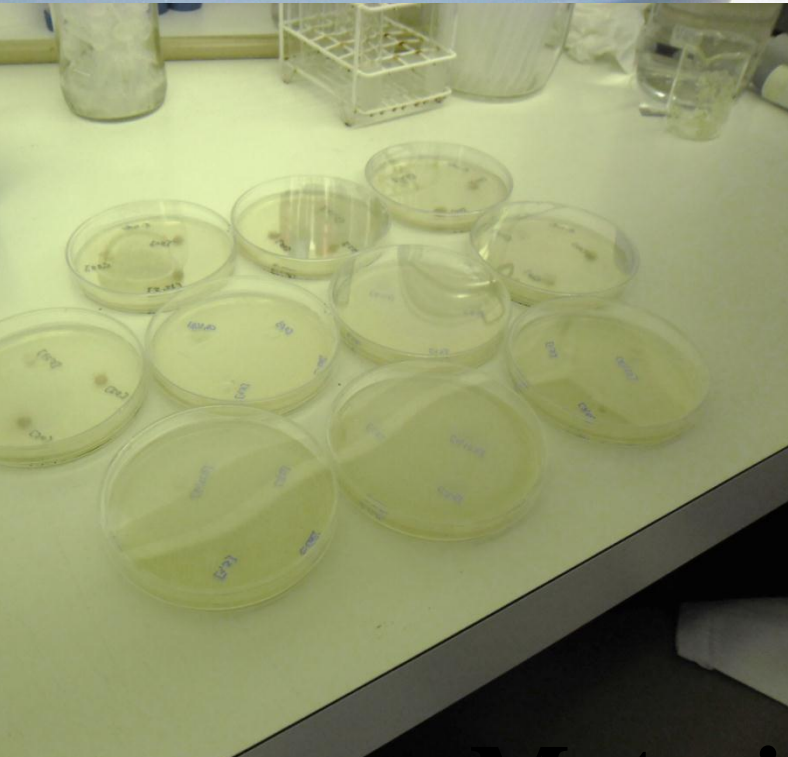
Contudo, os compostos fenólicos individuais presentes nas azeitonas, também têm revelado propriedades antimicrobianas, particularmente o composto hidroxitirosol (Bisignano *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2007) e oleuropeína (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2002). Em estudos realizados, Bisignano *et al.* (1999) verificaram que o composto hidroxitirosol e a oleuropeína inibiram o crescimento de bactérias, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* e *S. aureus*. Furneri *et al.* (2002), verificaram que o composto oleuropeína presente nas azeitonas de mesa, inibiram o crescimento de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma piru*.

Outros trabalhos publicados, também demonstraram que os compostos fenólicos hidroxitirosol e a oleuropeína, podiam ter ação na inibição ou atraso na taxa de crescimento de alguns agentes patogênicos presentes no trato gastrointestinal e no sistema respiratório, nomeadamente a *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginoliticus* (Briante *et al.*, 2004).

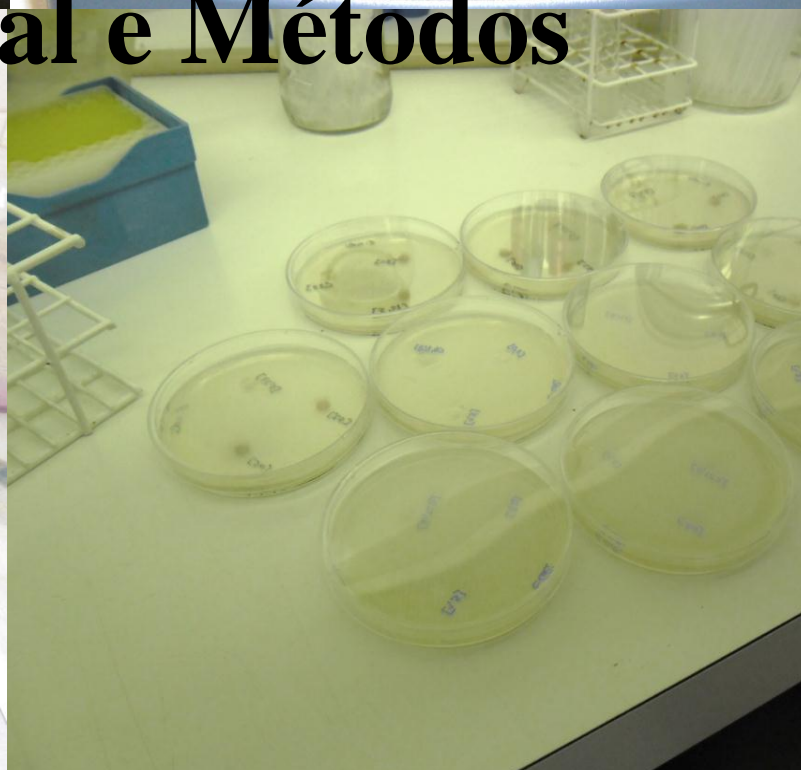
As azeitonas de mesa e os seus compostos fenólicos podem ser considerados bons candidatos, como agentes antimicrobianos, para aplicar contra bactérias responsáveis por infecções gastrointestinais e infecções respiratórias no ser humano (Pereira *et al.*, 2006).



Capítulo 3



Material e Métodos



3.1- Caracterização das amostras e amostragem

As amostras utilizadas para o presente trabalho foram recolhidas em produtores artesanais na região de Trás-os-Montes em Janeiro de 2011. Na Figura 5 encontram-se em realce os concelhos onde ocorreu a recolha de amostras.

As primeiras amostras foram colhidas em produtores de localidades pertencentes ao concelho de Mirandela, nomeadamente Vale de Gouvinhas, Lilela (Valpaços), Succães e em Mirandela (Figura 5, Tabela 3).

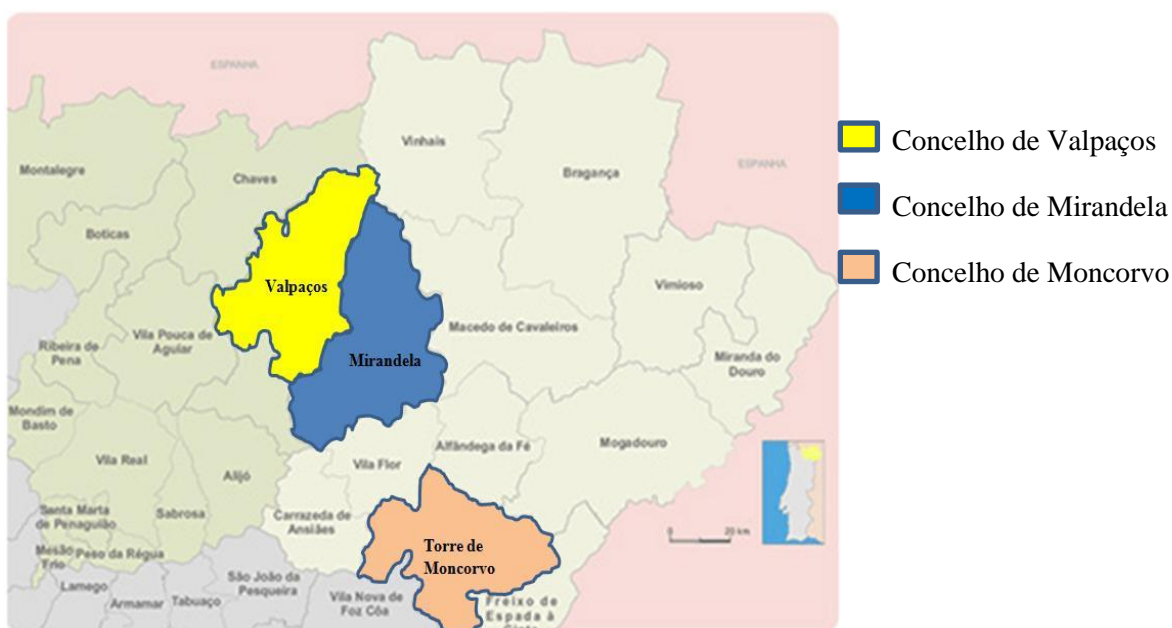


Figura 5: Área geográfica dos concelhos de Trás-os-Montes onde se recolheram as amostras de azeitonas de mesa.

Nesta fase de colheita foram recolhidas vinte e duas amostras, maioritariamente pertencentes à cultivar Cobrançosa, sendo que apenas uma amostra pertenceu à cultivar Negrinha de Freixo, recolhida no produtor de Lilela. Foram também recolhidas duas amostras no concelho de Moncorvo, pertencentes à cultivar Negrinha de Freixo. Na Figura 6 apresentam-se algumas imagens de amostras de azeitonas de mesa Transmontanas e na Tabela 3 faz-se uma caracterização sumária das amostras recolhidas.

Em cada produtor foram recolhidos cerca de 1,5 kg de azeitonas. A colheita foi feita para frascos previamente esterilizados e hermeticamente fechados. De cada

produtor foi também obtida a informação constante na Tabela 3, no que respeita à variedade e processamento.

Em laboratório, as amostras foram descaroçadas, de modo a obter um peso de polpa considerado suficiente e representativo, para a realização das avaliações da atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e fração fenólica. A polpa foi congelada a -20 °C e posteriormente liofilizada. Após liofilização as amostras foram guardadas em local fresco e seco, no escuro, para preservar as suas características.



Produtor 1
Azeitonas pretas ao natural



Produtor 9
Azeitonas mistas ao natural



Produtor 13
Azeitonas mistas ao natural



Produtor 15
Azeitonas verdes ao natural



Produtor 20
Azeitonas pretas ao natural



Produtor 21
Azeitonas verdes ao natural

Figura 6: Exemplo de azeitonas verdes, mistas e pretas ao natural recolhidas na região de Trás-os-Montes.

Tabela 3: Caracterização detalhada das amostras em estudo.

| Amostras | Tipo de azeitona | Cultivar | Origem geográfica |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------------|
| 1 | Azeitona Preta natural | Cobrançosa | Vale de Gouvinhas |
| 2 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Vale de Gouvinhas |
| 3 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Vale de Gouvinhas |
| 4 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 5 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 6 | Azeitona Mista (Retalhada) | Cobrançosa | Vale de Gouvinhas |
| 7 | Azeitona Verde natural (Retalhadas) | Cobrançosa | Lilela, Valpaços |
| 8 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 9 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Valverde, Valpaços |
| 10 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Lilela, Valpaços |
| 11 | Azeitona Mista natural (Retalhadas) | Cobrançosa | Lilela, Valpaços |
| 12 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Valverde, Valpaços |
| 13 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Valverde, Valpaços |
| 14 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Suçaes |
| 15 | Azeitona Verde natural (Retalhada) | Negrinha de Freixo | Lilela, Valpaços |
| 16 | Azeitona Mista natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 17 | Azeitona Verde natural | Negrinha de Freixo | Mós-Moncorvo |
| 18 | Azeitona Verde natural | Negrinha de Freixo | Mós-Moncorvo |
| 19 | Azeitona Mista | Cobrançosa | Valverde, Valpaços |
| 20 | Azeitona Preta natural | Cobrançosa | Vale de Gouvinhas |
| 21 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 22 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Mirandela |
| 23 | Azeitona Verde natural | Cobrançosa | Suçaes |
| 24 | Azeitonas Retalhadas | Cobrançosa | Mirandela |

3.2- Preparação dos extratos aquosos

A metodologia utilizada para o processo de extração, foi baseada em trabalhos anteriormente realizados com azeitonas de mesa da região Trás-os-Montes (Malheiro *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008)

As amostras previamente liofilizadas, foram trituradas com uma picadora Moulinex até se obter um pó fino, sendo guardadas e protegidas da luz até utilização posterior.

Para cada amostra foram pesados 5 g de azeitona moída que foram extraídas com 250 mL de água destilada e levado à ebulição numa placa de aquecimento durante 45 minutos. Seguidamente, filtrou-se o preparado com papel de filtro (Whatman nº 4) para um erlenmeyer, anteriormente pesado, para se poder obter no final o rendimento de extração. Após terem arrefecido, os extratos foram congelados e liofilizados.

Os extratos aquosos foram redissolvidos em água em concentrações a variar entre 25 mg/mL a 50 mg/mL para avaliação da fração fenólica. Posteriormente foram preparadas concentrações entre 0,01 mg/mL a 3 mg/mL para a atividade antioxidante e entre 12,5 mg/mL a 100 mg/mL para a atividade antimicrobiana. As concentrações escolhidas baseiam-se num conjunto de ensaios prévios realizados para a escolha da gama de concentrações a utilizar.

3.3- Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Para proceder à identificação e quantificação dos compostos fenólicos, cada extrato aquoso liofilizado foi pesado em quantidades a variar entre 25 mg/mL a 50 mg/mL e redissolvido em água ultrapura. De seguida a solução de extrato foi filtrada num filtro de membrana com uma porosidade de 0,2 µm (Nylon membrane (Whatman)) e injetado numa quantidade de 20 µL num módulo de separação HPLC Knauer Smartline, equipado com um sistema de injeção automática “Knauer smartline autosampler 3800” arrefecido a 4 °C e com um detetor de díodos (DAD). Foi usada uma coluna C18 Nucleosil (Macherey-Nagel) de fase reversa (Spherisorb ODS2) com um diâmetro de partícula de 250 x 4 mm id, 5 µm, mantida a 30 °C (em forno de aquecimento).

A separação cromatográfica foi feita com recurso a um sistema de gradiente, composto pelos seguintes solventes, água/ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B).

O fluxo foi de 0,9 mL/min com o seguinte gradiente: 5% de B aos 0 min, 15% de B aos 3 min, 25% de B aos 13 min, 30% de B aos 25 min, 35% de B aos 35 min, 40% de B aos 39 min, 45% de B aos 42 min, 45% de B aos 45 min, 47% de B aos 50 min, 48% de B aos 60 min, 50% de B aos 64 min e 100% de B aos 66 min.

Os dados cromatográficos de todos os picos foram acumulados numa gama de 200-600 nm e os cromatogramas foram registados a 280, 320, 330 e 350 nm. Os dados adquiridos e o controlo remoto do sistema de HPLC foram efetuados com o software

ClarityChrom ® (Knauer, Berlim, Alemanha) e a pureza de cada pico também foi confirmada pelo software.

Os compostos de cada extrato foram identificados por apuramento do seu tempo de retenção na gama dos 200-600 nm, com padrões puros analisados nas mesmas condições cromatográficas, bem como, com dados de bibliografia e bases de dados de outros autores.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método do padrão externo (pela área do padrão a concentração conhecida). O hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol e tirosol foram quantificados a 280 nm. O ácido 5-*O*-cafeoilquinico foi quantificado a 320 nm, o verbascosídeo e seu derivado a 330 nm e os restantes compostos a 350 nm. O hidroxitirosol glicol foi quantificado como hidroxitirosol e o ácido 5-*O*-cafeoilquinico com o ácido clorogénico. O derivado do verbascosídeo foi quantificado como o verbascosídeo e os restantes compostos foram quantificados como eles próprios.

3.4- Atividade Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi determinada através da análise de dois métodos químicos: o efeito bloqueador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo método do poder redutor.

3.4.1- Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

Avaliação da capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi monitorizada de acordo com o método de Hatano *et al.* (1988), com algumas adaptações de acordo com Malheiro *et al.* (2011).

A partir do extrato obtido no item anterior (3.2), preparou-se em tubos de ensaio, oito concentrações (0,01; 0,1; 0,2; 0,35; 0,5; 1; 2; 3 mg/mL) em triplicado. De seguida 0,3 mL das várias concentrações de extrato de cada amostra foram misturadas com 2,7 mL da solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/L).

A mistura foi agitada vigorosamente e foi colocada a repousar num local escuro à temperatura ambiente durante 60 minutos. A redução do radical DPPH foi medida por monitorização contínua do decréscimo da absorção no espectrofotómetro a 517 nm.

O efeito bloqueador do radical DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_s) / A_{\text{DPPH}}] \times 100,$$

Em que A_s é a absorvância da solução com extrato e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração do extrato a que corresponde 50% de inibição (EC_{50}), foi calculada a partir do gráfico da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato na solução.

3.4.2- Determinação do Poder Redutor

Para a determinação do poder redutor foi seguida a metodologia descrita por Berker *et al.* (2007). Assim, utilizou-se 1 mL das várias concentrações de extrato de cada amostra e colocou-se num tubo de ensaio, no qual se adicionou 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2M (pH = 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. Seguidamente a mistura foi a incubar a 50 °C durante 20 minutos e deixou-se a arrefecer à temperatura ambiente.

Após o arrefecimento colocaram-se 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% e agitaram-se os tubos vigorosamente. Retiraram-se 2,5 mL do sobrenadante e adicionaram-se 2,5 mL de água destilada, 0,5 mL de cloreto férrico a 1% e esperou-se 2 minutos para se ler as absorvâncias a 700 nm. A concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da absorvância registada a 700 nm em função da concentração do extrato correspondente.

3.5- Atividade Antimicrobiana

Como uma abordagem preliminar, para avaliar o efeito antimicrobiano, as amostras sobre as quais incidiu este estudo, foram reunidas consoante o seu poder antioxidante, ou seja, duas amostras com maior atividade antioxidante (amostras 21 e 22), duas com um poder antioxidante menor (amostras 7 e 13) e duas amostras com um poder antioxidante intermédio (amostras 8 e 12). De seguida foram determinadas as concentrações necessárias (12,5; 25; 50; 75; 100 mg/mL) a partir dos extratos aquosos das amostras obtidos no item 3.2.

3.5.1- Microrganismos utilizados e condições de cultura

Para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras, foram utilizadas estirpes de bactérias Gram-positivo (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus*) e duas bactérias Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os microrganismos utilizados provêm da coleção do departamento de Biologia da Universidade do Minho.

As bactérias foram mantidas a 4° C em meio agar LB [NaCl a 1% (p/v), tripton a 1% (p/v), extrato de levedura a 0,5% (p/v) e agar a 2% (p/v)], sendo periodicamente incubadas numa estufa a 37 °C.

3.5.2- Ensaio preliminares da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana com uma triagem de quatro bactérias Gram-positivo e duas bactérias Gram-negativo, e a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI em mg/mL), foram baseados numa adaptação do método da difusão em agar, baseado na difusão radial (Hawkey & Lewis, 1994; Malheiro *et al.*, 2012).

Foram preparadas as suspensões dos microrganismos, a fim de conter aproximadamente 10^6 ufc/mL (Figura 7) e transferiu-se para o meio agar overlay (0,8%). Desta mistura retirou-se um volume de 6 mL e aplicou-se sobre a superfície das placas contendo o meio LB. Foram feitos 2 a 3 poços no centro do meio sólido (3 mm de profundidade, 6 mm de diâmetro) nos quais foram colocados um volume de 60 µL de cada concentração para cada amostra, em triplicado.

A CMI foi considerada como sendo a menor concentração da amostra testada que seja capaz de inibir o crescimento das bactérias após 24 horas a 37 °C. As zonas de inibição foram medidas através do diâmetro, que apresentava cada orifício, utilizando-se uma régua com uma precisão de 0,5 mm. Cada diâmetro da zona de inibição foi medido três vezes (vertical, diagonal e horizontalmente) e os resultados foram expressos como uma média das medições da zona de inibição em mm.

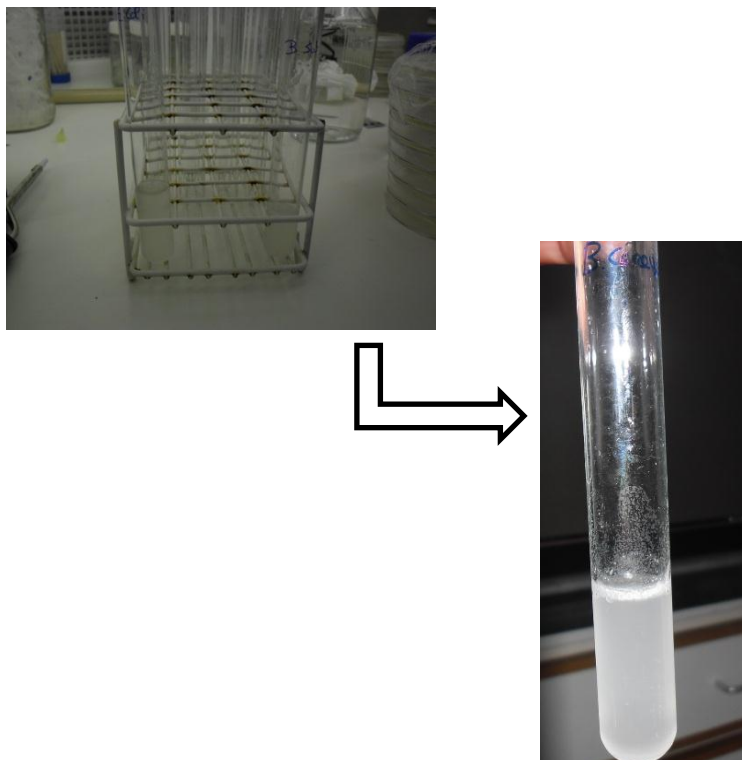


Figura 7: Exemplo da suspensão do microrganismo *B. cereus* contendo aproximadamente 10^6 ufc/mL.

3.6- Análise Estatística

3.6.1. Análise de regressão linear

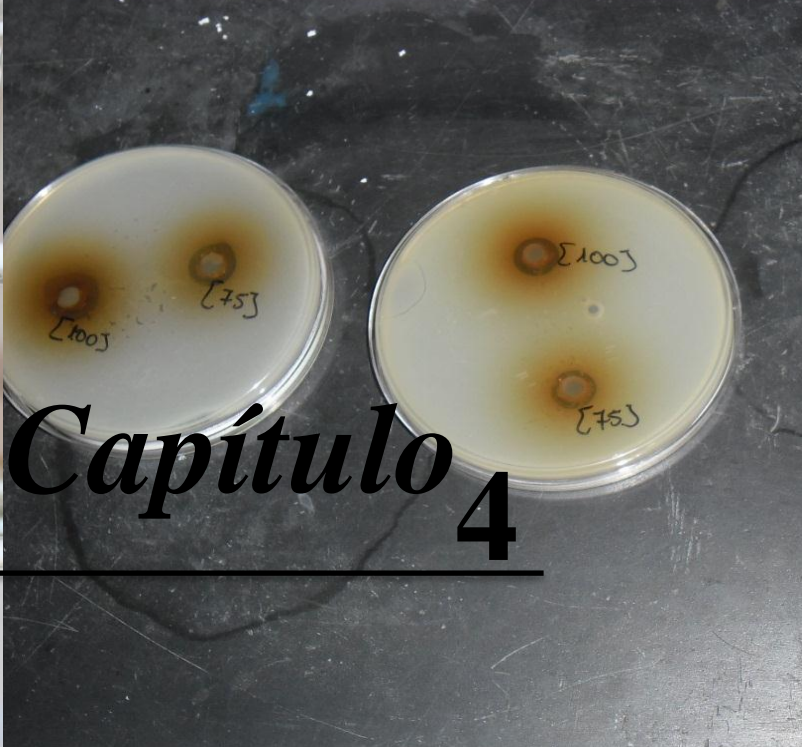
A análise de regressão linear foi realizada, com a utilização do Excel (Microsoft Corporation), correlacionando os teores de cada composto fenólico identificado, bem como o teor em compostos fenólicos totais, com os valores de EC_{50} obtidos nos métodos testados na atividade antioxidante (DPPH e poder redutor) para as 24 amostras de azeitonas de mesa Transmontanas.

3.6.2. Análise de componentes principais

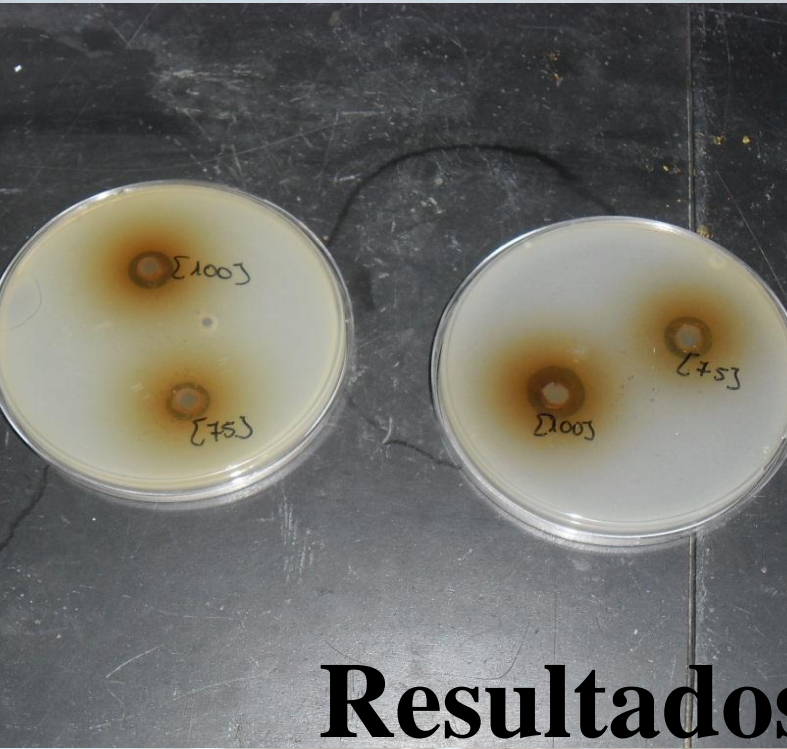
A análise de componentes principais (ACP) foi realizada usando o software SPSS, versão 19.0 (IBM Corporation, Nova Iorque, E.U.A.). Esta técnica quimiométrica foi aplicada para reduzir o número de variáveis (correspondentes aos compostos fenólicos

identificados (exceto a luteolina 7-*O*-glucósido e apigenina), teor em compostos fenólicos totais e valores de EC₅₀ obtidos nos métodos do DPPH e poder redutor) a um número inferior de novas variáveis derivadas (componentes principais ou fatores) que sumariam adequadamente a informação original, ou seja, o perfil em compostos fenólicos e atividade antioxidante de vinte e quatro amostras de azeitonas de mesa de fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes.

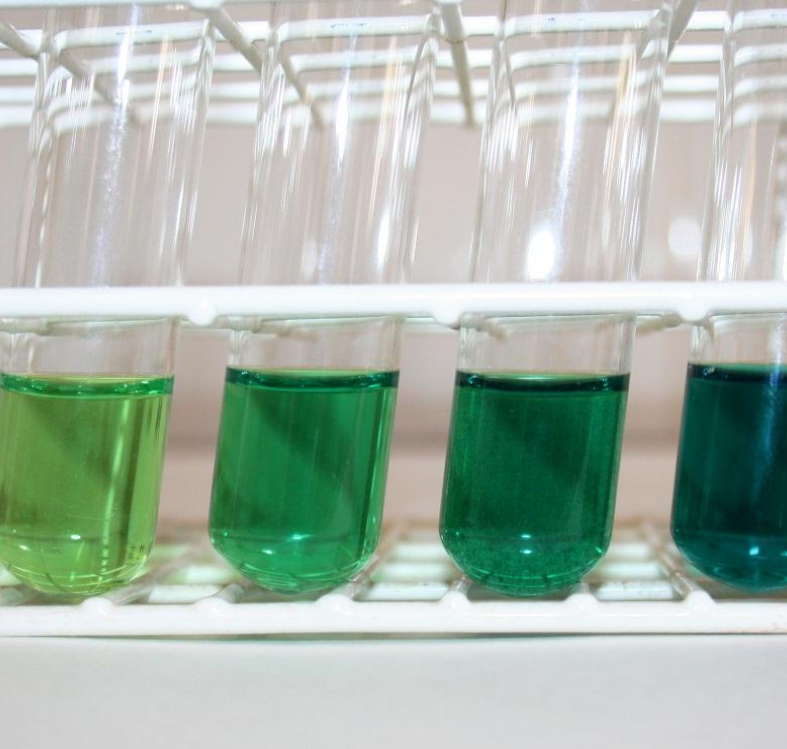
Além disso a ACP permite reconhecer padrões nos dados colocando-os num espaço multidimensional, usando para esse efeito as novas variáveis derivadas como dimensões. O objetivo da ACP é produzir componentes capazes de serem usadas como predições ou variáveis de resposta em análises subsequentes. O número de fatores a manter no tratamento dos dados foi avaliado pelo *Screen plot*, tomando em consideração os *eigenvalues* e a consistência interna através do valor do α -Cronbach's (Rencher, 1995).



Capítulo 4



Resultados e Discussão



4.1- Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Na análise da composição fenólica por HPLC/DAD, foi observável, embora em um número reduzido de amostras, a presença das classes mais importante de compostos fenólicos, nomeadamente, os álcoois fenólicos, ácidos fenólicos e flavonóides.

As vinte e quatro amostras estudadas revelaram qualitativamente e quantitativamente diferentes perfis fenólicos, nos quais foram identificados e quantificados dez compostos fenólicos, nomeadamente, hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol, tirosol, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, derivado de verbascosídeo, verbascosídeo, luteolina 7-*O*-glucósido, rutina, apigenina 7-*O*-glucósido e apigenina (Figura 8 e 9). Em azeitonas das cultivares usadas neste trabalho, foram previamente identificados diversos compostos fenólicos, entres eles o hidroxitirosol, a oleuropeína, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, verbascosídeo, cianidina 3-*O*-glucósido, cianidina 3-*O*-rutinósido, luteolina 7-*O*-glucósido, rutina, apigenina 7-*O*-glucósido, e luteolina (Vinha *et al.*, 2005). As diferenças observadas não serão de estranhar uma vez que no trabalho realizado por esses autores as azeitonas utilizadas foram frescas, sem qualquer tipo de tratamento. A existência de alterações no perfil fenólico durante a fermentação foi reportada em diferentes trabalhos (Blekas *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004a; Romero *et al.*, 2004b; Ben Othman *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009a).

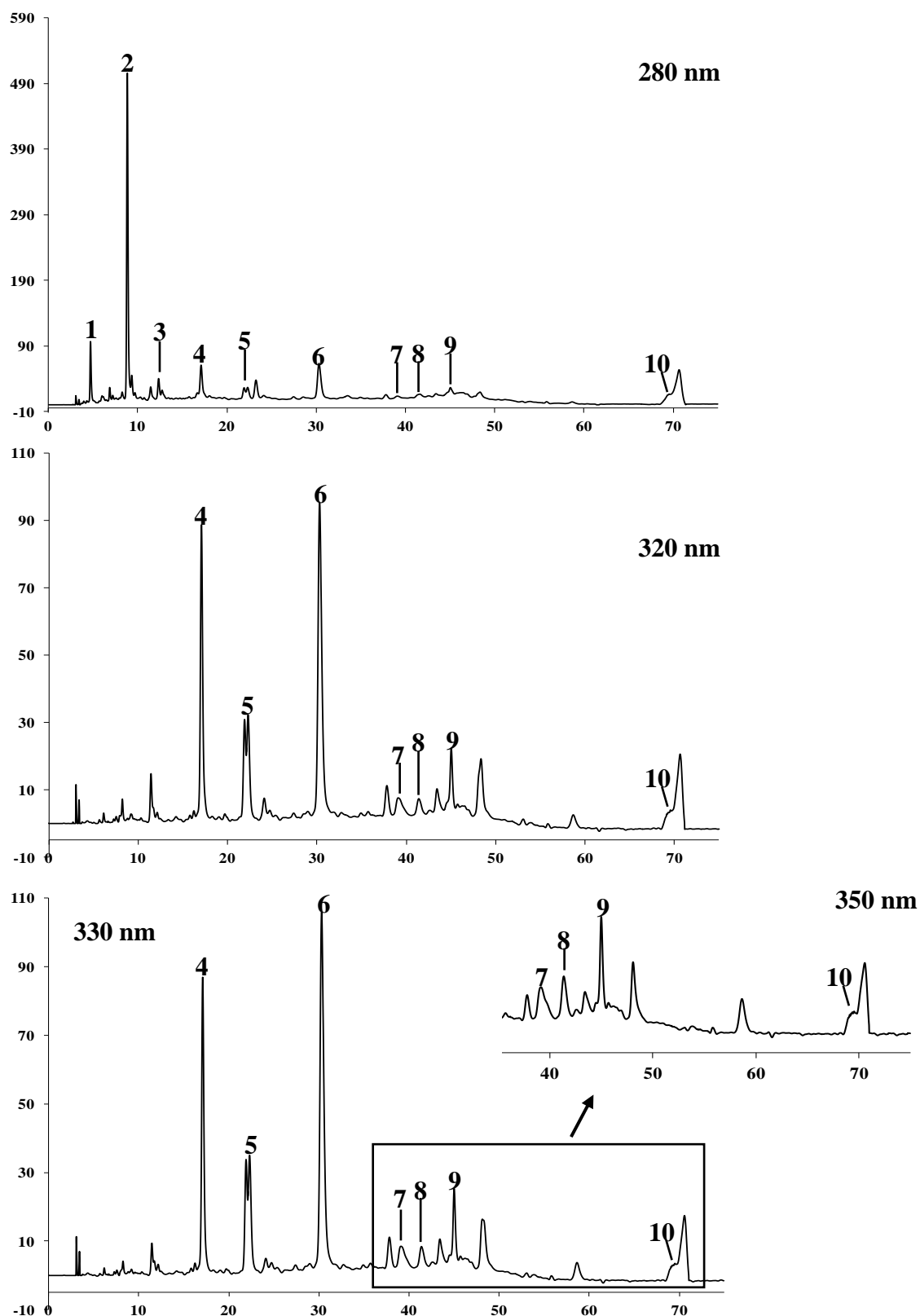


Figura 8: Cromatograma (HPLC) do perfil fenólico de azeitonas de mesa transmontanas. Detecção a 280 nm, 320 nm e 350 nm: (1) hidroxitirosol glicol; (2) hidroxitirosol; (3) tirosol; (4) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (5) derivado de verbascosídeo; (6) verbascosídeo; (7) luteolina 7-*O*-glucósido; (8) rutina; (9) apigenina 7-*O*-glucósido; (10) apigenina

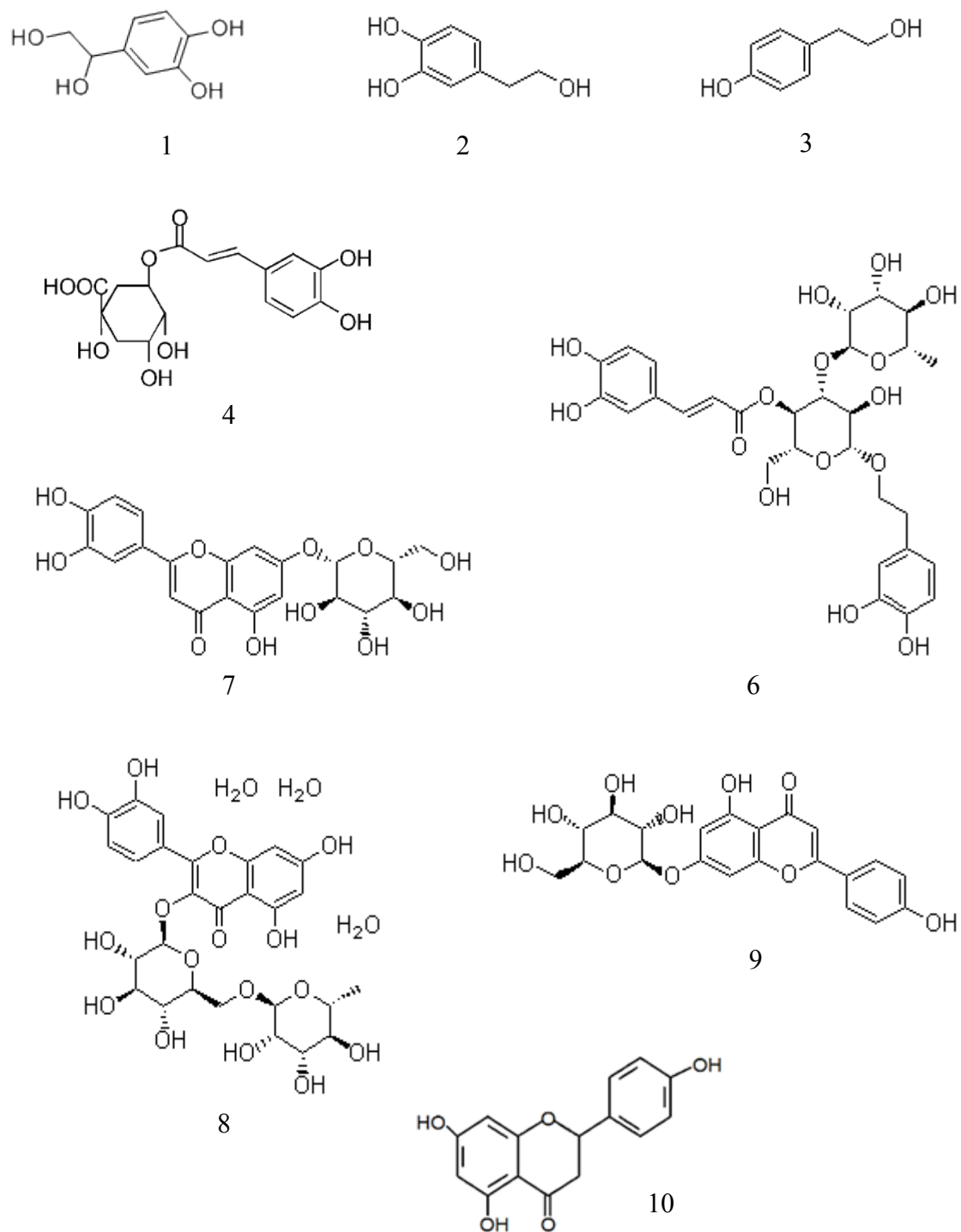


Figura 9: Estrutura química dos compostos fenólicos identificados nos extratos de azeitonas de mesa de Trás-os-Montes: (1) hidroxitirosol glicol; (2) hidroxitirosol; (3) tirosol; (4) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (6) verbascosídeo; (7) luteolina 7-*O*-glucósido; (8) rutina; (9) apigenina 7-*O*-glucósido; (10) apigenina.

As amostras de azeitonas de mesa analisadas revelaram diferenças consideráveis na quantidade total e individual dos compostos fenólicos (Tabela 4). Tal facto pode estar relacionado com diferentes fatores como sejam, aspetos agronómicos, a cultivar, e o estado de maturação do fruto aquando da colheita.

A quantificação total dos compostos fenólicos variou de 2,37 µg de fenóis/mg de extrato (amostra 24) para 64,17 µg/mg (amostra 23). Entre os compostos fenólicos identificados, os mais abundantes foram o hidroxitirosol, hidroxitirosol glicol, derivado de verbascosídeo, verbascosídeo e tirosol. O composto fenólico hidroxitirosol foi o composto identificado em maior quantidade, variando de 0,63 µg/mg (amostra 24) para 34,17 µg/mg (amostra 17). Estes resultados podem ser devido ao facto do composto hidroxitirosol ser obtido por hidrólise do composto fenólico oleuropeína (Briante *et al.*, 2002; Damak *et al.*, 2008), visto que a oleuropeína é o principal composto fenólico em azeitonas frescas não processadas (Vinha *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006), o que explica a sua ausência nas amostras analisadas, uma vez que são azeitonas de fermentação natural onde é removido todo o amargor presente nas azeitonas não processadas. Na verdade, estes resultados, face ao hidroxitirosol, estão em concordância com a literatura, visto que o hidroxitirosol foi o composto fenólico maioritário identificado nas azeitonas de mesa (Romero *et al.*, 2004a; Romero *et al.*, 2004b; Boskou *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006; Malheiro *et al.*, 2011).

O hidroxitirosol glicol foi identificado em todas as amostras em estudo. O seu conteúdo variou entre 0,29 µg/mg (amostra 15) e 16,56 µg/mg (amostra 22). Além de estar presente em azeitonas de mesa, este composto também se encontra em azeitonas frescas, azeites e em águas ruças (Marsilio *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009a; Bouaziz *et al.*, 2010; Romero & Brenes, 2012).

O tirosol é um álcool fenólico usualmente presente nas azeitonas de mesa, embora em quantidades inferiores do que as apresentadas pelo hidroxitirosol (Romani *et al.*, 1999). Em vários estudos publicados sobre compostos fenólicos nas azeitonas de mesa, indicam que o hidroxitirosol e o tirosol são os principais fenóis presentes no produto final (Rodríguez *et al.*, 2009a). No entanto, nas amostras analisadas o tirosol foi quantificado em pequenas concentrações variando de 0,37 µg/mg (amostra 24) para 10,48 µg/mg (amostra 17), estando mesmo ausente na amostra 20 (Tabela 4).

Tabela 4: Perfil fenólico, expresso em µg de composto fenólico/mg de extrato, das amostras em estudo (média ± desvio padrão; n = 2).

| | Hidroxitirosol glicol | Hidroxitirosol | Tirosol | Ácido 5-O-cafeoilquínico | Derivado de verbascosídeo | Verbascosídeo | Luteolina 7-O-glucósido | Rutina | Apigenina 7-O-glucósido | Apigenina | Σ FENÓIS |
|------------|-----------------------|----------------|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-----------|--------------|
| A1 | 0,48 ± 0,03 | 7,70 ± 0,90 | 0,83 ± 0,08 | 0,26 ± 0,03 | 1,40 ± 0,23 | 1,99 ± 0,35 | nq | nq | 0,05 ± 0,01 | nq | 12,70 ± 1,55 |
| A2 | 0,61 ± 0,03 | 9,40 ± 0,40 | 1,16 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,29 ± 0,05 | 0,20 ± 0,02 | - | - | nq | nq | 11,84 ± 0,43 |
| A3 | 1,67 ± 0,03 | 10,38 ± 0,26 | 1,34 ± 0,08 | 0,31 ± 0,01 | 2,25 ± 0,10 | 1,32 ± 0,13 | nq | - | nq | nq | 17,26 ± 0,55 |
| A4 | 0,37 ± 0,02 | 14,84 ± 0,00 | 1,69 ± 0,02 | 0,23 ± 0,03 | 0,89 ± 0,04 | 9,36 ± 0,01 | - | nq | nq | nq | 27,37 ± 0,09 |
| A5 | 0,36 ± 0,01 | 9,11 ± 0,36 | 0,91 ± 0,06 | 0,20 ± 0,00 | 1,09 ± 0,07 | 4,81 ± 0,61 | - | nq | 0,13 ± 0,01 | nq | 16,60 ± 1,07 |
| A6 | 0,61 ± 0,02 | 5,59 ± 0,11 | 0,81 ± 0,06 | 0,17 ± 0,01 | 0,65 ± 0,07 | 0,71 ± 0,07 | - | nq | - | nq | 8,55 ± 0,10 |
| A7 | 1,34 ± 0,05 | 7,34 ± 0,60 | 1,06 ± 0,07 | 0,29 ± 0,01 | 0,20 ± 0,02 | 0,23 ± 0,01 | - | nq | nq | nq | 10,46 ± 0,68 |
| A8 | 0,79 ± 0,05 | 12,51 ± 0,11 | 1,57 ± 0,20 | nq | 1,11 ± 0,09 | 2,69 ± 0,12 | - | nq | 0,15 ± 0,01 | nq | 18,83 ± 0,27 |
| A9 | 1,73 ± 0,47 | 13,18 ± 1,39 | 1,55 ± 0,12 | 0,88 ± 0,35 | 1,21 ± 0,18 | 2,67 ± 0,44 | nq | 0,59 ± 0,06 | 0,22 ± 0,02 | nq | 22,03 ± 2,95 |
| A10 | 1,63 ± 0,05 | 9,63 ± 0,03 | 0,83 ± 0,04 | 0,24 ± 0,01 | 3,09 ± 0,70 | 3,30 ± 0,55 | - | nq | nq | nq | 18,73 ± 1,15 |
| A11 | 1,52 ± 0,01 | 3,59 ± 0,16 | 0,69 ± 0,10 | 0,14 ± 0,01 | 0,85 ± 0,02 | 0,57 ± 0,03 | nq | 0,18 ± 0,02 | - | nq | 7,54 ± 0,25 |
| A12 | 2,00 ± 0,06 | 5,32 ± 0,42 | 0,65 ± 0,07 | nq | 0,34 ± 0,26 | 0,30 ± 0,13 | nq | nq | nq | nq | 8,63 ± 0,89 |
| A13 | 0,62 ± 0,18 | 4,91 ± 0,36 | 0,57 ± 0,06 | 0,33 ± 0,12 | 0,75 ± 0,19 | 1,08 ± 0,35 | nq | nq | 0,10 ± 0,02 | nq | 8,35 ± 1,28 |
| A14 | 1,77 ± 0,07 | 13,48 ± 0,47 | 1,33 ± 0,39 | 0,48 ± 0,03 | 1,76 ± 0,13 | 2,20 ± 0,32 | nq | nq | nq | nq | 21,02 ± 0,93 |
| A15 | 0,29 ± 0,02 | 3,57 ± 0,21 | 0,82 ± 0,06 | - | 0,05 ± 0,00 | 0,09 ± 0,01 | nq | nq | nq | nq | 4,83 ± 0,25 |
| A16 | 0,59 ± 0,01 | 12,29 ± 0,92 | 2,17 ± 0,20 | - | - | - | - | - | - | nq | 15,05 ± 1,01 |
| A17 | 4,33 ± 0,31 | 34,17 ± 0,58 | 10,48 ± 0,39 | - | 0,20 ± 0,03 | 0,22 ± 0,06 | - | - | nq | nq | 49,40 ± 0,36 |
| A18 | 0,42 ± 0,03 | 9,21 ± 0,73 | 1,61 ± 0,14 | nq | 0,11 ± 0,03 | 0,14 ± 0,03 | - | - | - | nq | 11,49 ± 0,76 |
| A19 | 2,62 ± 0,00 | 7,42 ± 0,08 | 0,97 ± 0,06 | nq | 4,37 ± 0,09 | 3,85 ± 0,08 | - | 1,34 ± 0,06 | 0,18 ± 0,00 | nq | 20,76 ± 0,37 |
| A20 | 11,81 ± 0,69 | 5,32 ± 0,56 | - | nq | 9,44 ± 0,06 | 2,64 ± 0,04 | nq | nq | 0,49 ± 0,05 | nq | 29,71 ± 1,18 |
| A21 | 6,47 ± 0,62 | 27,29 ± 2,23 | 7,29 ± 0,34 | - | 8,21 ± 1,61 | 4,74 ± 0,36 | nq | nq | nq | nq | 54,01 ± 4,95 |
| A22 | 16,56 ± 0,03 | 14,81 ± 0,27 | 1,98 ± 0,09 | - | 19,12 ± 4,96 | 8,24 ± 1,81 | nq | nq | - | nq | 60,72 ± 6,98 |
| A23 | 15,24 ± 0,57 | 16,50 ± 0,04 | 2,56 ± 0,06 | 0,46 ± 0,06 | 17,51 ± 1,25 | 8,60 ± 0,88 | nq | 3,31 ± 0,32 | - | nq | 64,17 ± 2,83 |
| A24 | 1,28 ± 0,07 | 0,63 ± 0,03 | 0,37 ± 0,01 | nq | 0,10 ± 0,01 | - | nq | - | nq | nq | 2,37 ± 0,10 |

Diferenças assinaláveis foram também evidentes nos flavonóides, luteolina 7-*O*-glucósido, rutina e apigenina 7-*O*-glucósido, que foram identificados somente em algumas amostras. Embora tenha sido detetado o composto luteolina 7-*O*-glucósido não foi possível a sua quantificação, e o mesmo se observou com a apigenina, uma vez que os seus teores se encontravam abaixo do limite de quantificação. Por sua vez, a rutina foi quantificada em apenas quatro amostras, com quantidades reduzidas, a variar entre 0,59 µg/mg (amostra 9) e 3,31 µg/mg (amostra 23), nas restantes amostras a sua quantificação não foi possível. A apigenina 7-*O*-glucósido já foi quantificada em um número superior de amostras, mas em concentrações muito baixas a variar entre 0,05 µg/mg (amostra 1) e 0,49 µg/mg (amostra 20).

De acordo com trabalhos publicados para azeitonas de mesa portuguesas (Pereira *et al.*, 2006), os resultados descritos estão, em parte, relacionados com os obtidos para os flavonóides luteolina 7-*O*-glucósido e rutina, pois também foram quantificados em pequenas quantidades e/ou ausentes em algumas amostras, como o verificado neste trabalho. É de salientar, que em trabalhos realizados com azeitonas frescas não processadas foram identificados e quantificados os compostos luteolina 7-*O*-glucósido, rutina e apigenina 7-*O*-glucósido, em todas as amostras de azeitonas analisadas (Vinha *et al.*, 2005; Vinha *et al.*, 2002) e em teores consideráveis, contrariamente verificado no presente trabalho para estes compostos.

No que respeita ao ácido 5-*O*-cafeoilquínico, este composto também revelou diferenças consideráveis no perfil fenólico entre amostras, variando a sua concentração entre 0,14 µg/mg (amostra 11) e 0,88 µg/mg (amostra 9). É de referir que em algumas amostras não foi possível a sua quantificação, enquanto, em outras amostras a sua presença não foi detectada (Tabela 4). Tendência semelhante foi observada por Pereira *et al.* (2006) onde o ácido 5-*O*-cafeoilquínico foi identificado em apenas algumas amostras e quantificado em baixos teores.

Entre os compostos detetados, deve ser dirigida uma particular atenção aos compostos, derivados de verbascosídeo e verbascosídeo, visto que a concentração destes compostos foi muito diversificada entre amostras, nomeadamente, para o derivado de verbascosídeo, cuja concentração mais baixa foi de 0,05 µg/mg (amostra 15) e a concentração mais elevada foi observada na amostra 22 (19,12 µg/mg). Por outro lado, a concentração mais baixa do composto verbascosídeo também se verificou na amostra 15 (0,09 µg/mg), mas a maior quantidade foi verificada na amostra 4 (9,36 µg/mg).

Paralelamente, na mesma amostra (amostra 4) foi observado um teor bastante inferior (0,89 µg/mg) para o derivado de verbascosídeo.

O composto verbascosídeo, revelou um teor médio inferior (2,72 µg/mg) comparativamente ao seu derivado (3,26 µg/mg). Ambos os compostos não foram detectados na amostra 16, ainda que o verbascosídeo também não tenha sido identificado na amostra 24 (Tabela 4).

As diferenças de resultados para estes compostos podem justificar a cultivar a que pertencem as amostras, visto que as amostras onde se verificou uma menor quantidade de verbascosídeo e derivado de verbascosídeo pertencem à cultivar Negrinha de Freixo (amostras 15 e 18). Segundo Romani *et al.* (1999) a presença do composto fenólico verbascosídeo é muito diversificada entre as cultivares, e ainda é referido que estas diferenças de concentrações poderiam propor que este composto se comporta como um marcador quimiotaxonômico de diferentes cultivares.

É notório, que as amostras retalhadas (amostras 6, 11, 15 e 24) possuem um menor teor em compostos fenólicos totais, compreendidos entre 2,37 µg/mg e 4,88 µg/mg, o que possivelmente está relacionado com a difusão dos compostos para a salmoura, devido ao corte superficial que as azeitonas possuem, havendo uma diminuição da quantidade total de fenóis (Boskou *et al.*, 2006).

4.2-Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos analisados, foi medida através da realização de dois ensaios químicos diferentes: poder redutor e o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH.

No método do poder redutor, dependendo do poder de redução das diferentes concentrações utilizadas de cada extrato, é notável uma mudança de cor amarela das soluções para vários tons de cor verde e azul-esverdeado. Esta mudança ocorre devido à presença de compostos redutores, tais como antioxidantes, que levam à redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto à sua forma ferrosa (Pereira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007), monitorizada a 700nm.

No que respeita, ao método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, o DPPH é conhecido como um radical livre estável que possui um máximo de absorção característico entre 515 e 517nm. Na presença de compostos antioxidantes, o radical livre DPPH é reduzido à forma de hidrazina, devido à doação de eletrões pelo antioxidante. O DPPH em solução apresenta uma cor púrpura que sofre uma diminuição de cor para amarelo claro, devido à doação de eletrões e eliminação dos radicais livres (Boskou *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2008; Malheiro *et al.*, 2012). O método DPPH é uma ferramenta fundamental para ter acesso ao potencial antioxidante, mais especificamente, à atividade anti-radical presente em cada extrato (Malheiro *et al.*, 2011).

Na tabela 5, apresentam-se os resultados obtidos para o potencial antioxidante das vinte e quatro amostras de azeitonas de mesa analisadas e são expressos como valores de EC_{50} (mg de extrato/mL de solução).

Tabela 5: Rendimento de extração e valores de EC₅₀ das amostras de azeitonas de mesa estudadas.

| Amostra | Rendimento de extração (%) | Poder redutor (EC ₅₀ ^a) | DPPH (EC ₅₀ ^b) |
|---------|-------------------------------|---|--|
| 1 | 17,19 ± 0,139 | 0,91 ± 0,065 | 0,56 ± 0,004 |
| 2 | 24,74 ± 8,960 | 1,33 ± 0,130 | 0,53 ± 0,064 |
| 3 | 30,95 ± 0,068 | 1,26 ± 0,038 | 0,38 ± 0,026 |
| 4 | 22,66 ± 0,000 | 0,63 ± 0,011 | 0,44 ± 0,004 |
| 5 | 28,29 ± 4,732 | 0,79 ± 0,053 | 0,42 ± 0,014 |
| 6 | 23,85 ± 0,345 | 1,26 ± 0,121 | 0,47 ± 0,068 |
| 7 | 42,49 ± 26,595 | 1,46 ± 0,083 | 0,68 ± 0,032 |
| 8 | 25,95 ± 0,272 | 0,88 ± 0,033 | 0,35 ± 0,051 |
| 9 | 26,51 ± 14,047 | 1,33 ± 0,035 | 0,42 ± 0,080 |
| 10 | 20,59 ± 0,011 | 0,71 ± 0,048 | 0,28 ± 0,013 |
| 11 | 23,90 ± 0,238 | 1,30 ± 0,044 | 0,75 ± 0,026 |
| 12 | 17,50 ± 2,553 | 0,80 ± 0,092 | 0,42 ± 0,038 |
| 13 | 20,44 ± 3,266 | 1,46 ± 0,109 | 0,72 ± 0,058 |
| 14 | 10,61 ± 6,506 | 0,49 ± 0,083 | 0,22 ± 0,061 |
| 15 | 33,32 ± 4,009 | 1,59 ± 0,026 | 0,55 ± 0,041 |
| 16 | 22,06 ± 0,242 | 0,96 ± 0,078 | 0,53 ± 0,035 |
| 17 | 18,77 ± 3,307 | 0,36 ± 0,014 | 0,19 ± 0,003 |
| 18 | 28,61 ± 1,592 | 1,75 ± 0,057 | 0,83 ± 0,103 |
| 19 | 28,44 ± 5,880 | 0,63 ± 0,093 | 0,38 ± 0,022 |
| 20 | 22,05 ± 5,204 | 0,38 ± 0,003 | 0,19 ± 0,022 |
| 21 | 17,20 ± 0,382 | 0,41 ± 0,018 | 0,18 ± 0,011 |
| 22 | 26,10 ± 7,822 | 0,30 ± 0,009 | 0,13 ± 0,003 |
| 23 | 16,33 ± 0,387 | 0,30 ± 0,024 | 0,16 ± 0,005 |
| 24 | 21,73 ± 0,836 | 2,67 ± 0,112* | 1,85 ± 0,290* |

^aEC₅₀(mg/mL): concentração efetiva em que a absorvância é 0,5;

^bEC₅₀(mg/mL): concentração efetiva em que 50% dos radicais DPPH são eliminados;

*Valores de EC₂₅.

A análise do poder redutor permitiu observar que os extratos de azeitona de mesa analisados possuem compostos com capacidade redutora, que indicam o seu potencial antioxidante. Neste ensaio, verificou-se que o poder redutor dos extratos em estudo teve uma atividade dependente da concentração em teste (Figura 10).

Os valores de EC_{50} revelaram diferenças consideráveis entre amostras, nomeadamente, na amostra 24, onde só foi possível calcular o EC_{25} , cujo valor foi de 2,67 mg/mL, que faz com que esta amostra possua uma baixa atividade antioxidante. É também de referir as azeitonas provenientes da amostra 24 eram retalhadas, o que pode justificar o seu elevado valor de EC_{25} , uma vez que há uma perda maior dos compostos fenólicos presentes na amostra para a salmoura, devido ao corte superficial que estas apresentam. As amostras 7, 13, 15 e 18, também evidenciaram valores elevados de EC_{50} ($\geq 1,5$ mg/mL) que consequentemente indica um menor poder antioxidante destas azeitonas. Por outro lado, as amostras 21, 22 e 23 apresentaram valores de EC_{50} menores, compreendidos entre 0,30 mg/mL e 0,41 mg/mL, remetendo para uma maior atividade redutora presente nestes extractos, o que consequentemente acarreta uma maior atividade antioxidante.

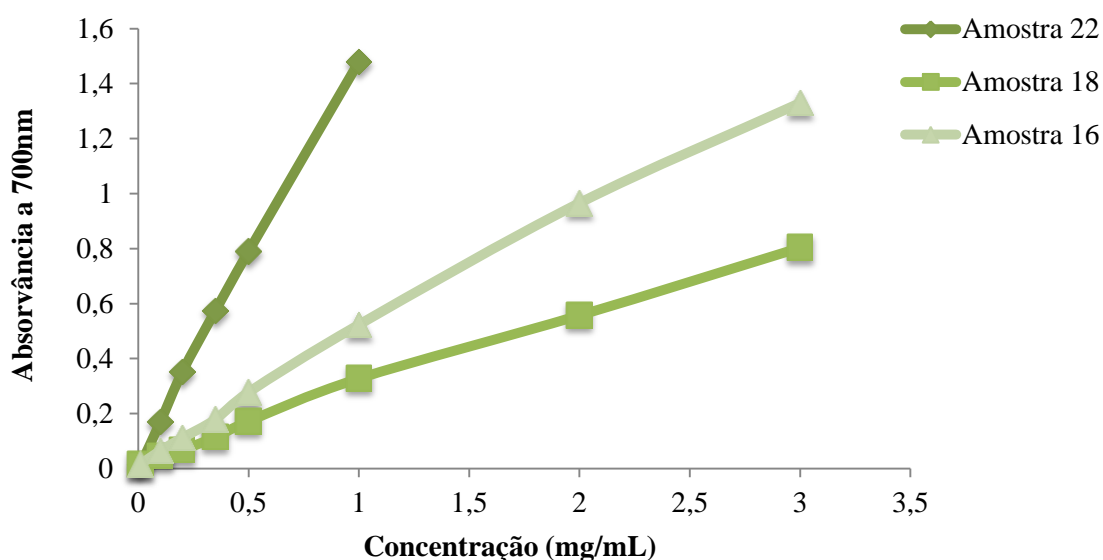


Figura 10: Poder redutor dos extratos provenientes das amostras 16, 18 e 22.

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos analisados, recorrendo ao método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, os resultados apresentam uma concordância com os resultados obtidos para o poder redutor. A amostra 24 apresentou o valor EC_{25} mais elevado (1,85 mg/mL) e os extratos 7, 13, 15 e 18 também revelaram valores de EC_{50} elevados (> 0,6 mg/mL), indicando o seu baixo potencial antioxidante. Contudo, as amostras 21, 22 e 23 apresentaram, tal como no método do poder redutor, valores de EC_{50} mais baixos compreendidos entre 0,18 mg/mL para 0,13 mg/mL.

Tal como no poder redutor, a atividade antiradicalar exibida pelos diferentes extratos dependeu da concentração testada (Figura 11).

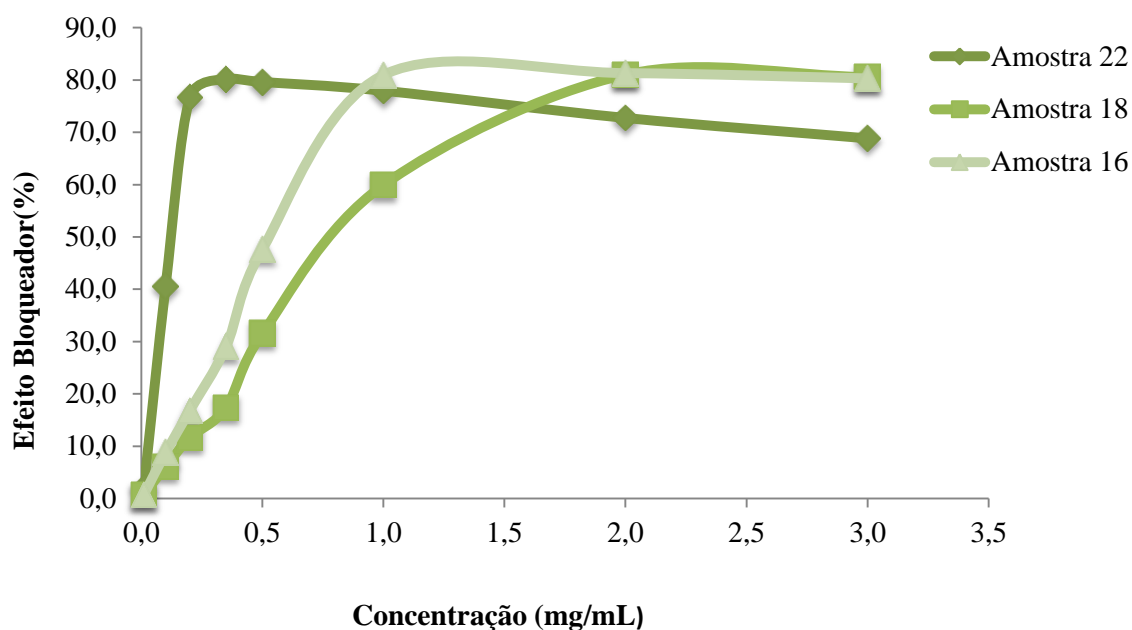


Figura 11: Efeito bloqueador do radical DPPH, em percentagem, dos extratos das amostras 16, 18 e 22.

O efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH dos extratos das azeitonas, aumentou proporcionalmente com a concentração de extrato. As amostras apresentaram um comportamento idêntico para concentrações superiores a 0,5 mg/mL, a partir da qual a percentagem de inibição permaneceu praticamente constante em volta dos 80%.

É de salientar que os resultados obtidos na atividade antioxidante, podem estar relacionados, pelo menos em parte, com os compostos fenólicos identificados em cada amostra de azeitona de mesa (Tabela 4). Assim as amostras 21, 22 e 23 que reportam

um maior teor de compostos fenólicos totais e um potencial antioxidante superior, apresentam uma tendência contrária à apresentada pelas amostras 13, 15 e 24, que apresentaram um menor teor em compostos fenólicos e uma atividade antioxidante inferior.

Ao comparar a atividade antioxidante obtida nas amostras analisadas, face a outros trabalhos realizados com azeitonas de mesa de cultivares Portuguesas, e processadas por diferentes estilos, nomeadamente Pereira *et al.* (2006), demonstraram que azeitonas de mesa processadas segundo o método de fermentação natural, revelaram um maior conteúdo em compostos fenólicos e conseqüentemente também apresentaram um maior potencial antioxidante. No entanto, ao comparar os valores obtidos no presente trabalho, face aos valores de Pereira *et al.* (2006) para azeitonas de mesa naturais, obtiveram valores superiores no ensaio do poder redutor (0,48 mg/mL) e o mesmo se verificou com os resultados do método DPPH (0,47 mg/mL), demonstrando uma menor atividade antioxidante relativamente às azeitonas de mesa analisadas.

Em azeitonas de mesa do tipo “alcaparras” também foi avaliada a atividade antioxidante (Malheiro *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008), e foram obtidos valores superiores para o método do poder redutor (1,40 mg/mL; 0,42 mg/mL, respectivamente para cada trabalho), comparativamente com os resultados do presente trabalho. Resultados mais semelhantes foram observados para o ensaio do DPPH (0,48 mg/mL; 0,47 mg/mL, respetivamente).

Dependendo da cultivar, do método de processamento e forma de apresentação as azeitonas de mesa podem ser consideradas uma boa fonte de antioxidantes (Romero *et al.*, 2004a). Todavia, para se alcançar um mesmo efeito nas azeitonas analisadas, é necessário um maior consumo das amostras que apresentam um menor teor em compostos antioxidantes.

4.3- Atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos seis extratos aquosos das azeitonas de mesa, foram testadas quatro bactérias Gram-positivo (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus*) e duas bactérias Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Estes microrganismos podem suscitar alguma preocupação, não só por serem causadores de deterioração de alimentos, mas também porque podem ser agentes causadores de infeções, nomeadamente no trato intestinal, em seres humanos (Sousa et al., 2006). Para avaliar o potencial antimicrobiano das azeitonas de mesa testadas, foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para as bactérias em questão.

Na figura 12 é feita uma elucidação da atividade antimicrobiana dos extratos 21 e 7. Embora os extratos de azeitona de mesa testados tenham revelado atividade antimicrobiana, a resposta para cada bactéria foi diferente consoante o extrato.

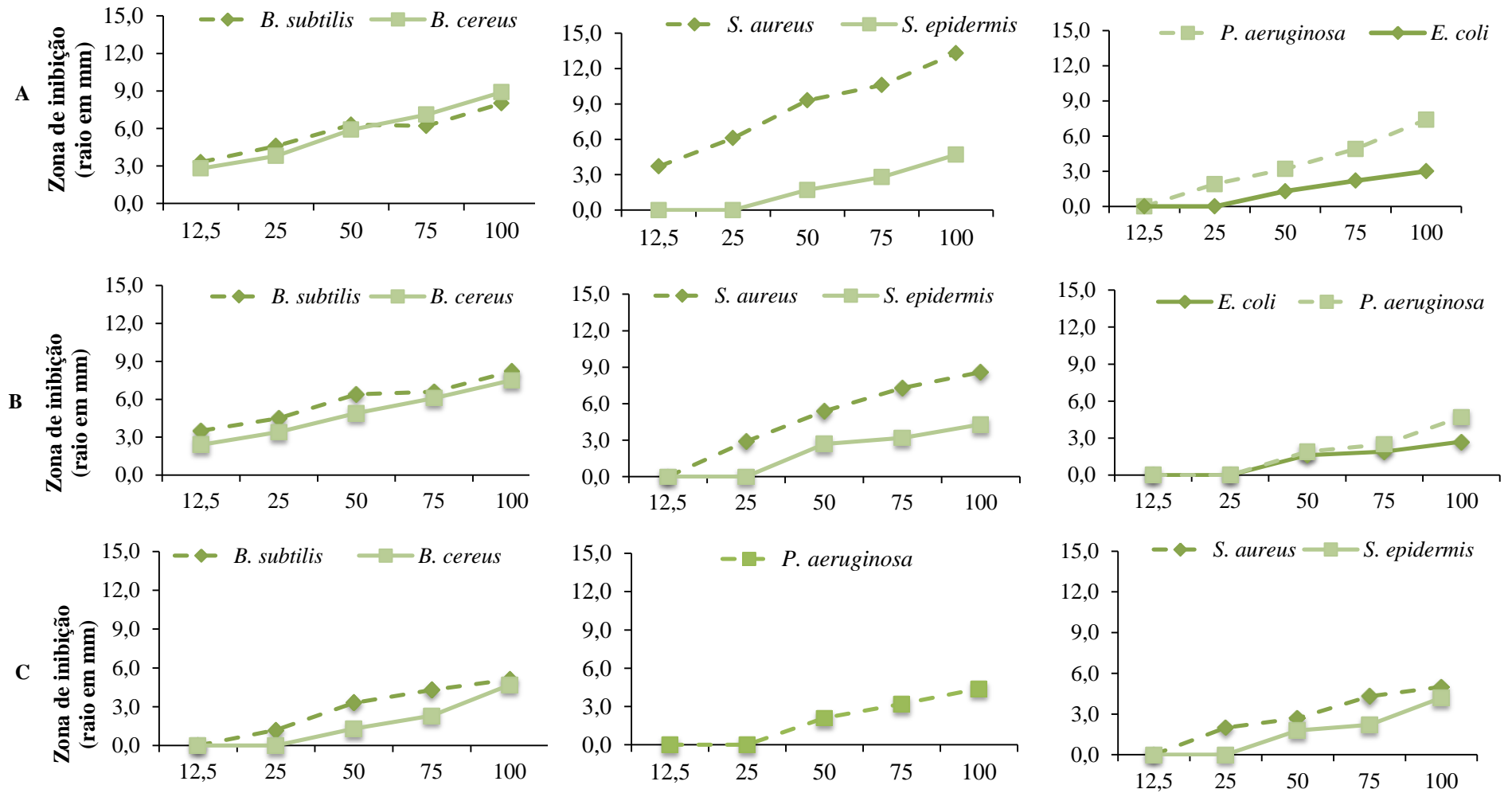


Figura 12: Atividade antimicrobiana dos extratos das amostras 21 (A), 8 (B) e 7 (C), nas diferentes concentrações testadas.

De um modo geral, os extratos das amostras 21, 22 e 8 exibiram uma maior atividade antimicrobiana (Tabela 6), com inibições consideráveis em todos os microrganismos, mesmo nas concentrações mais baixas (12,5 mg/mL e 25 mg/mL). De facto estes dois extratos revelaram um maior raio de inibição em todas as bactérias testadas, particularmente para o *B. cereus* (Figura 12). Estes resultados podem estar parcialmente relacionados com o teor em compostos fenólicos totais que estes extratos possuem, como demonstrado neste trabalho.

O extrato da amostra 12 apresentou uma atividade antimicrobiana modesta, com concentrações mínimas inibitórias, variando entre 25 mg/mL e 50 mg/mL, proporcionando inibições em todos os microrganismos, com exceção da *E. coli* (microrganismo Gram negativo). No entanto o extrato 12, exibiu uma atividade antimicrobiana elevada (zona de inibição 4-5 mm) para o microrganismo *S. aureus*, com menor CMI (25 mg/mL). Por sua vez, o extrato da amostra 7 exibiu uma atividade antimicrobiana fraca na inibição do crescimento de todos os microrganismos, sem qualquer atividade contra a bactéria *E.coli*.



Figura 13: Exemplo da atividade antimicrobiana do extrato 21, sobre o crescimento da bactéria Gram + (*B. cereus*) nas maiores e menores concentrações de inibição (12,5 e 100 mg/mL).

Tabela 6: Atividade antimicrobiana dos extratos das azeitonas de mesa testados.^a

| Amostras | CIM (mg/mL) | | | | | |
|----------|--------------------|------------------|----------------|---------------------|------------------|----------------------|
| | <i>B. subtilis</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. epidermis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| 21 | 12,5 (++) | 12,5 (++) | 50 (+) | 50 (+) | 12,5 (++) | 25 (+) |
| 22 | 12,5 (++) | 12,5 (++) | 50 (+) | 50 (+) | 25 (++) | 25 (++) |
| 8 | 12,5 (++) | 12,5 (++) | 50 (+) | 50 (++) | 25 (++) | 50 (+) |
| 12 | 25 (+) | 25 (+) | (-) | 50 (+) | 25 (+++) | 50 (+) |
| 7 | 25 (+) | 50 (+) | (-) | 50 (+) | 50 (+) | 50 (++) |
| 13 | 25 (++) | 50 (+) | (-) | 75 (++) | 50 (+++) | 50 (++) |

^a Nenhuma atividade antimicrobiana (-), zona de inibição <1 mm; Atividade antimicrobiana reduzida (+), zona de inibição entre 1-2 mm; Atividade antimicrobiana moderada (+ +), zona de inibição entre 2-3 mm; Atividade antimicrobiana elevada (+ + +), zona de inibição 4-5 mm; Atividade antimicrobiana forte (+ + + +), zona de inibição > 6 mm; Desvio padrão de ± 0,5 mm.

As bactérias Gram-positivo (*B. cereus*, e *B. subtilis*) foram as mais susceptíveis ao potencial antimicrobiano dos extratos das amostras 8, 21 e 22 com valores muito baixos de CMI (12,5 mg/mL). É de salientar, que as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis*, seguido do *S. aureus*, foram os microrganismos mais sensíveis, sendo o seu crescimento inibido por todos os extratos testados com valores de CMI entre 12,5 e 50 mg/mL. O *S. epidermis* foi a bactéria Gram-positivo mais resistente para todos os extratos, apresentando valores de CMI mais elevados, variando entre 50 mg/mL e 75 mg/mL, que conduziu a uma menor inibição deste microrganismo

Relativamente às bactérias Gram-negativo, a *P. aeruginosa* foi a bactéria mais susceptível à atividade antimicrobiana de todos os extratos analisados. Por outro lado, a *E. coli* foi a bactéria mais resistente, com uma CMI de 50 mg/mL para três extratos (Tabela 6), sendo que nos restantes não se verificou nenhuma atividade. Contudo, em trabalhos publicados, relatos sobre a atividade antimicrobiana das azeitonas de mesa portuguesas (Pereira *et al.*, 2006), a bactéria *E. coli*, juntamente com o *B. cereus*, foram os microrganismos mais sensíveis, sendo inibidos por todos os extratos de azeitonas testados. Embora houvesse alguma tendência similar entre o estudo atual e os anteriores, a maioria dos resultados diferiram dos obtidos.

Em outros estudos publicados relativos às propriedades antimicrobianas de extratos vegetais, as bactérias Gram-negativo, exibiram uma maior resistência em relação às propriedades antimicrobianas dos extratos, comparativamente com as bactérias Gram-positivo (Proestos *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Malheiro *et al.*, 2012). Tal facto deve-se à estrutura da parede bacteriana. As bactérias Gram-negativo possuem uma membrana externa constituída por lipopolisacárideos (Beveridge, 1999), que atua como uma barreira de permeabilidade, protegendo as bactérias e impossibilitando a entrada dos agentes microbianos, conferindo assim maior resistência à bactéria, facto não partilhado pelas bactérias Gram-positivo. Daí os nossos resultados revelarem uma maior resistência dos microrganismos Gram-negativo em detrimento dos microrganismos Gram-positivo.

Em suma, possivelmente, a composição química dos extratos das azeitonas de mesa analisados, nomeadamente o teor em compostos fenólicos, teve uma grande influência no potencial antimicrobiano observado. Pois, como foi anteriormente demonstrado, o efeito de ação dos compostos fenólicos está dependente da sua própria concentração (Furneri *et al.*, 2002). Os resultados obtidos demonstram ter uma grande importância, visto que os extratos das azeitonas analisados apresentaram uma ação

protetora fornecida pelos compostos fenólicos, contribuindo para atividade contra vários microrganismos patogênicos, podendo diminuir o risco de infecções bacterianas, especialmente no trato intestinal (Pereira *et al.*, 2006).

4.4- Análise estatística

4.4.1- Correlação entre a composição fenólica e a atividade antioxidante

As amostras com maior atividade antioxidante (amostra 22 e 23) e com menores valores de EC_{50} , revelaram também uma maior concentração de fenóis totais, além disso, as amostras com maiores valores de EC_{50} amostras (15 e 24) em ambos os ensaios químicos, apresentaram uma menor atividade antioxidante e estão entre as amostras com menor teor em fenóis totais. Quanto à análise da regressão, foi efetuada entre os valores de EC_{50} obtidos na avaliação antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais, apresentando correlações extremamente significativas entre os valores de EC_{50} do ensaio DPPH ($R^2= 0,325$, $P < 0,001$) e do método do poder redutor ($R^2= 0,513$, $P < 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7: Correlação entre os compostos fenólicos e a respetiva atividade antioxidante das azeitonas de mesa transmontanas.

| Compostos Fenólicos | DPPH (EC ₅₀) | | | Poder redutor (EC ₅₀) | | |
|----------------------------------|--------------------------|----------------|------|-----------------------------------|----------------|------|
| | Equação | R ² | P | Equação | R ² | P |
| Hidroxitirosol glicol | $y = -0,031x + 0,562$ | 0,160 | *** | $y = -0,067x + 1,220$ | 0,314 | *** |
| Hidroxitirosol | $y = -0,025x + 0,727$ | 0,264 | *** | $y = -0,044x + 1,477$ | 0,345 | *** |
| Tirosol | $y = -0,047x + 0,551$ | 0,095 | *** | $y = -0,096x + 1,178$ | 0,157 | *** |
| Ácido 5-O-cafeoilquínico | $y = -0,216x + 0,502$ | 0,019 | n.s. | $y = 0,041x + 0,998$ | 0,000 | n.s. |
| Derivado de verbascosídeo | $y = -0,028x + 0,554$ | 0,178 | *** | $y = -0,058x + 1,188$ | 0,304 | *** |
| Verbascosídeo | $y = -0,061x + 0,609$ | 0,212 | *** | $y = -0,125x + 1,299$ | 0,358 | *** |
| Rutina | $y = -0,094x + 0,487$ | 0,036 | n.s. | $y = -0,204x + 1,052$ | 0,069 | * |
| Apigenina 7-O-glucósido | $y = -0,579x + 0,498$ | 0,034 | n.s. | $y = -1,038x + 1,063$ | 0,045 | ** |
| Fenóis totais | $y = -0,011x + 0,714$ | 0,325 | *** | $y = -0,023x + 1,496$ | 0,513 | *** |

n.s. – não significativo. * $P \leq 0,05$ – correlação significativa. ** $P \leq 0,01$ – correlação muito significativa. *** $P \leq 0,001$ – correlação extremamente significativa.

Pela análise da regressão, realizada entre os valores de EC₅₀ obtidos na avaliação do potencial antioxidante e os teores dos compostos fenólicos identificados, foram reveladas correlações extremamente significativas ($P < 0,001$) entre os compostos fenólicos, hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol, tirosol, verbascosídeo e derivado de verbascosídeo, com a atividade antioxidante obtida nos extratos das azeitonas de mesa analisadas (Tabela 7). Analisando o declive das equações obtidas, verifica-se que este é negativo em todas as regressões efetuadas. Isto indica que quanto maior for o teor em determinado composto fenólico, menor será o valor de EC₅₀ obtido, ao que corresponde um maior potencial antioxidante.

Estes resultados não implicam que os outros compostos fenólicos, nomeadamente, o ácido 5-*O*-cafeoilquinico, rutina e apigenina 7-*O*-glucósido, onde a correlação não foi significativa, não contribuem para atividade antioxidante geral das azeitonas de mesa transmontanas, só que face a estes resultados os compostos fenólicos com $P \leq 0,001$, possuem uma correlação extremamente significativa, logo seriam titulados como os intervenientes principais na atividade antioxidante. Pois de acordo com vários trabalhos publicados, é relatada a atividade antioxidante que estes compostos fenólicos possuem, principalmente do hidroxitirosol (Visioli *et al.*, 2002; O'Dowd *et al.*, 2004; D'Angelo *et al.*, 2005; González-Santiago *et al.*, 2006; Pereira-Caro *et al.*, 2009; Tokuşođlu *et al.*, 2010) e do tirosol (González-Santiago *et al.*, 2010; Madrona *et al.*, 2011). O hidroxitirosol glicol também contribui para a atividade antioxidante geral dos extratos, uma vez que este composto apresenta uma atividade ainda maior que a reportada pelo hidroxitirosol (Rodríguez *et al.*, 2007).

De acordo com a literatura, trabalhos realizados com diferentes amostras, também demonstraram ter correlações idênticas entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (Oliveira *et al.*, 2008; Malheiro *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012).

4.4.2- Análise de componentes principais (ACP)

De modo a resumir toda a informação obtida no perfil em compostos fenólicos e na atividade antioxidante registada em vinte e quatro amostras de azeitonas de mesa de fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes, foi aplicada uma análise de componentes principais aos dados obtidos. Com a aplicação desta técnica quimiométrica, com o uso de apenas duas componentes principais, foi possível explicar 64,42% da variabilidade observada nos dados (48,11% na primeira dimensão e 16,31% na segunda dimensão). Na Figura 14 verifica-se que a distribuição espacial das amostras permite verificar 3 grupos principais.

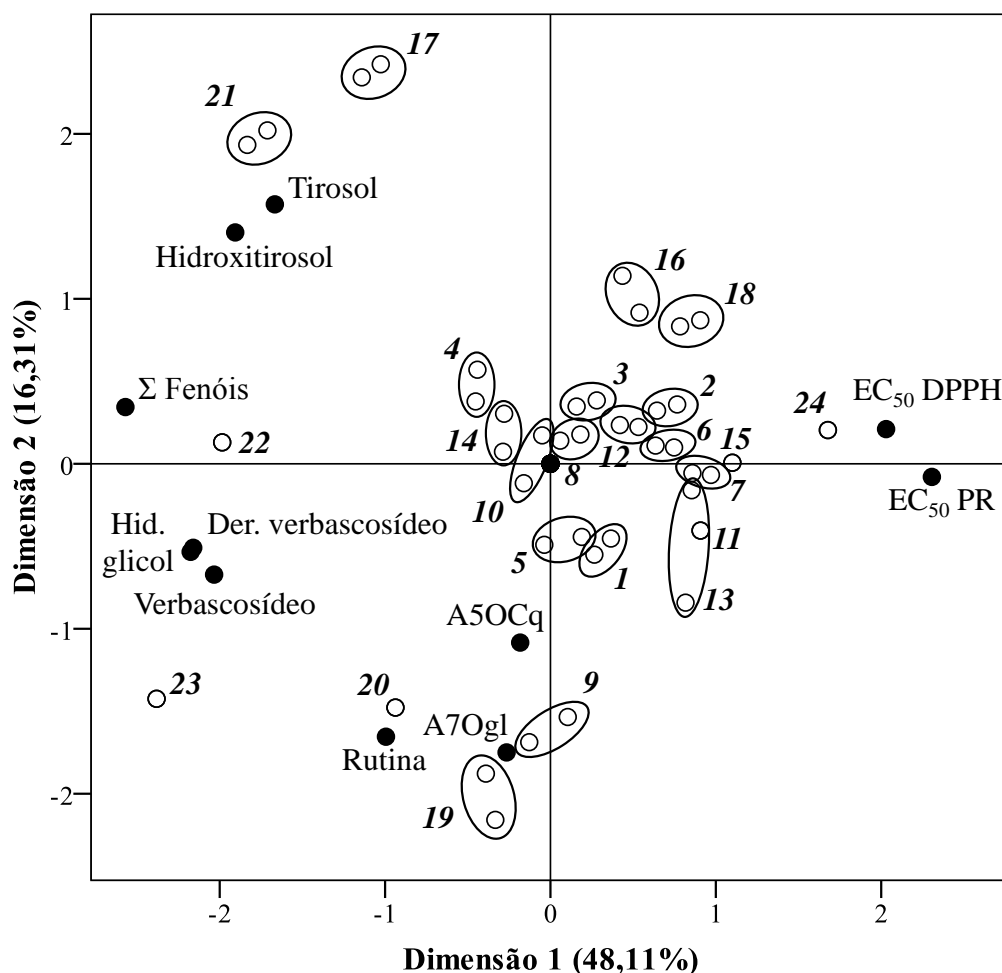


Figura 14: Análise de componentes principais usando o perfil em compostos fenólicos, teor em fenóis totais e valores de EC₅₀ registados na atividade antioxidante de 24 amostras de azeitonas de mesa de fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes. As componentes principais explicam 64,42% da variância total dos dados. Hid. Glicol = hidroxitirosol glicol; A7Ogl = apigenina 7-O-glucósido; A5OCq = ácido 5-O-cafeoilquinico; PR = poder redutor.

Num primeiro grupo (constituído pelas amostras 17, 21, 22 e 23) estão representadas as amostras com um elevado teor em compostos fenólicos totais com valores superiores a 50 µg de compostos fenólicos por mg de extrato. As amostras 17 e 21 (representadas na região negativa da primeira dimensão e na região positiva da segunda dimensão) são caracterizadas por um elevado teor em hidroxitirosol e tirosol, enquanto as amostras 22 e 23 (representadas maioritariamente nas regiões negativas de ambas as componentes principais) são altamente ricas em verbascosídeo e seu derivado e em hidroxitirosol glicol (Figura 14, Tabela 4). Representada no extremo oposto das amostras 17, 21, 22 e 23, está representada a amostra 24, visto ter sido a amostra que possui menor teor em fenóis e a que apresentou valores de EC₂₅ mais elevados para ambos os métodos de atividade antioxidante testados (Figura 14, Tabela 4; Tabela 5). Na zona central da Figura 14, estão representadas as restantes amostras. Estas amostras possuem um teor em fenóis totais intermédio, bem como uma atividade antioxidante mediana entre todas as amostras em estudo. É de salientar que a amostra 9 tem um elevado teor em ácido 5-*O*-cafeoilquínico e as amostras 9, 19 e 20 possuem um teor elevado em apigenina 7-*O*-glucósido.

O padrão observado na ACP vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho. Do ponto de vista da contribuição de cada composto fenólico para a atividade antioxidante global, o hidroxitirosol glicol, o hidroxitirosol, o verbascosídeo e seu derivado foram os compostos que mais contribuíram para baixos valores de EC₅₀, tendo-se obtido correlações negativas extremamente significativas (Tabela 7). Estes compostos estão associados ao primeiro grupo de amostras (amostras 17, 21, 22 e 23), tendo estas também elevado teor em compostos fenólicos o que contribui para a obtenção de um potencial antioxidante mais elevado. O fator contrário é observado para a amostra 24, onde se encontram maiores valores de EC₂₅, menores teores em fenóis totais, bem como em compostos fenólicos individuais que contribuem para o potencial antioxidante, sendo assim, estas amostras são menos ativas do ponto de vista antioxidante.

A close-up photograph of an olive branch. The branch is covered with numerous small, green, oval-shaped olives. The leaves are silvery-green, elongated, and have a slightly waxy texture. The lighting is bright, creating highlights on the olives and leaves.

Capítulo 5

Conclusão

5- CONCLUSÃO

O processo de fermentação natural para a produção de azeitona de mesa é uma tradição de longa data na região de Trás-os-Montes. Neste processo as azeitonas não são sujeitas a qualquer tratamento alcalino, são imersas em salmoura onde ocorre a fermentação, devido maioritariamente, à atividade de leveduras. É necessário que ocorram alterações físico-químicas durante o processo de fermentação que alterem ou eliminem parcialmente o amargor (devido principalmente à oleuropeína) que é característico dos frutos frescos, permitindo que as azeitonas se tornem edíveis.

As azeitonas de mesa transmontanas obtidas por fermentação natural são uma rica fonte de compostos fenólicos com relevante importância bioativa. No estudo da composição fenólica das vinte e quatro amostras de azeitona de mesa naturais, foram identificados e quantificados dez compostos fenólicos, nomeadamente, hidroxitirosol glicol, hidroxitirosol, tirosol, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, derivado verbascosídeo, verbascosídeo, luteolina 7-*O*-glucósido, rutina, apigenina 7-*O*-glucósido e apigenina, tendo sido o hidroxitirosol glicol e o hidroxitirosol os compostos fenólicos mais abundantes. Os teores em fenóis totais foram muito díspares entre as vinte e quatro amostras, a variar entre 2,37 e 64,17 µg de fenóis/mg de extrato. É de salientar que as amostras retalhadas (corte superficial), reportaram uma menor quantidade em fenóis totais, havendo uma maior perda dos compostos fenólicos para a salmoura durante a fermentação.

Ao nível da atividade antioxidante, as amostras com maiores teores em compostos fenólicos, exibiram um maior potencial antioxidante face às amostras com um menor teor em estes compostos. O hidroxitirosol glicol, o hidroxitirosol, o verbascosídeo e derivado de verbascosídeo bem como o teor em compostos fenólicos totais foram os que mais contribuíram para um maior potencial antioxidante.

No que respeita à atividade antimicrobiana, as amostras testadas revelaram ser inibidoras do crescimento de alguns tipos de bactérias quer Gram-positivo quer Gram-negativo, embora, a resposta para cada bactéria testada tenha sido diferente de acordo com o extrato avaliado. *B. subtilis* e *B. cereus*, seguido do *S. aureus*, foram os microrganismos mais sensíveis, sendo o seu crescimento inibido por todos os extratos testados com CMI baixas. A bactéria *E. coli* foi a mais resistente nos extratos analisados.

As azeitonas de mesa obtidas por fermentação natural provenientes de Trás-os-Montes revelam possuir uma elevada atividade biológica (atividade antioxidante e antimicrobiana) e ao serem consumidas apresentam benefícios para o organismo do consumidor, uma vez que é conhecida a sua ação preventiva de doenças em que os radicais livres estão envolvidos e contra microrganismos patogénicos para o Homem. De entre os resultados obtidos, a cultivar, o período de colheita da azeitona e o ano de colheita poderão ser aspetos preponderantes que justifiquem a variabilidade observada nas amostras analisadas.

Assim, com o presente trabalho pretendeu-se reunir informação necessária que possibilite a caracterização das azeitonas de mesa produzidas artesanalmente na região transmontana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiot, M. J.; Fleuriot, A. & Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 823–826.
- Aponte, M.; Ventrino, V.; Blaiotta, G.; Volpe, G.; Farina, V.; Avellone, G.; Lanza, C. M. & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, **27**, 162-170
- Arantes, R. (2008). Avaliação da ação do pó da folha de oliveira (D-lenolato) em indicadores fisiológicos do murganho. Dissertação de mestrado em Biologia Clínica Laboratorial. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real; pp 1-74.
- Arroyo-López, F. N.; Querol, A.; Bautista-Gallego, J. & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 189–196.
- Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F. & Garrido-Fernández, A. (2010). Predictive microbiology and table olives. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 1452-1461. Vol. II, *Formatex Research Center, Badajoz*, Espanha. ISBN (13): 978-84-614-6195.
- Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Barrio, E.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A. & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, **147**, 89–96.
- Ben Othman, N.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, P. & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, 662-669.

- Berker, K.; Güçlü, K.; Tor, I. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP) and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**, 1157–1165.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, **181**, 4275-4733.
- Bian, S. & Jiang, Y. (2009). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, **120**, 264-270.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 229-242.
- Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N. & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 971-974.
- Boskou, G.; Salta, F. N.; Chrysostomou, S.; Mylona, A.; Chiou, A. & Andrikopoulos, N. K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, **94**, 558-564.
- Bouaziz, M.; Jemai, H.; Khabou, W. & Sayadi, S. (2010). Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1750-1758.
- Blekas, G.; Vassilakis, C.; Harizanis, C.; Tsimidou, M. & Boskou, D. G. (2002). Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3688-3692.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J.J. & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3535-3540.
- Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sánchez, A. H. & Garrido, A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2702-2706.
- Briante, R.; Patumi, M.; Terenziani, S.; Bismuto, E.; Febraio, F. & Nucci, R. (2002). *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: Antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4934-4940.
- Briante, R.; Patumi, M.; Febbraio, F. & Nucci, R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, **111**, 67-77.

- Cardinali, A.; Pati, S.; Minervini, F.; D'Antuono, I.; Linsalata, V. & Lattanzio, V. (2012). Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 1822–1829.
- Cardoso, S. M.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lopes-da-Silva, J. A.; Renard, C. M. G. C. & Coimbra, M. A. (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**:21–32.
- Cardoso, M. S.; Mafra, I.; Reis, A.; Nunes, C.; Saraiva, J. A. & Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *Food Science and Technology*, **43**, 153–160.
- COI, G.; Zullo, B. A. & Cioccia, G. (2005). Effect of lipase producing yeast on the oily fraction of microbiologically debittered table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 851–856.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2004). Trade standard applying to table olives. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Acedido a 14 de Maio de 2012.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2011). <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>. Acedido a 16 de Maio de 2012.
- Conde, C.; Delrot, S. & Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 1545-1562.
- Charoenprasert, S. & Mitchell, A. (2012). Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 7081-7095.
- Damak, N.; Bouaziz, M.; Ayadi, M.; Sayadi, S. & Damak, M. (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1560–1566.
- De Castro, A. & Brenes, M. (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, **36**, 797-802.

- D'Angelo, S.; Ingrosso, D.; Migliardi, V.; Sorrentino, A.; Donnarumma, G.; Baroni, A.; Masella, L.; Tufano, M.A.; Zappia, M. & Galletti, P. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**, 908-919.
- Esti, M.; Cinquanta, L. & La Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 32-35.
- Faiza, I.; Wahiba, K.; Nassira, G.; Chahrazed, B. & Atik, B. F. (2011). Antibacterial and antifungal Activities of olive (*Olea europaea* L.) from Algeria. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **2**, 69-73.
- Fernández, A. G.; Díez, M. J .F. & Adams, M. R. (1997). Table olives. Production and Processing. *Chapman & Hall*. London, UK.
- Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Soares, M. E.; Bastos, M. L. & Pereira, J. A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, **103**, 188-195.
- Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N. & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal Antimicrobial Agents* , **20**, 293-296.
- Gómez, A. H. S.; Garcia, P. G. & Navarro, L. R. (2006). Trends in table olive production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, 86-94.
- Gómez-Rico, A.; Fregapane, G. & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, **41**, 433–440.
- González-Santiago, M.; Martín-Bautista, E.; Carrero, J. J.; Fonollá, J.; Baró, L.; Bartolomé, M. V.; Gil-Loyzaga, P. & López-Huertas, E. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, **188**, 35–42.
- González-Santiago, M.; Fonollá, J.; Lopez-Huertas, E. (2010). Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacological Research*, **61**, 364–370.

- Gutierrez-Rosales, F.; Romero, M. P.; Casanovas, M.; Motilva, M. J. & Minguez-Mosquera, M. I. (2010). Metabolites Involved in Oleuropein Accumulation and Degradation in Fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 12924–12933.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, M. K.; Gilani, A. & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 3291-3340.
- Hammami, S. B. M.; Manrique, T. & Rapoport, H. F. (2011). Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae*, **130**, 445-451.
- Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T. & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative. e astringency and scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 2090-2097.
- Hawkey, P. M. & Lewis, D. A. (1994). *Medical Bacterology: A Practical Approach*; Oxford University, UK; pp. 181-194.
- Huang, D.; Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- INE, 2011. Estatística de produção vegetal. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&userLoadSave=Load&userTableOrder=173&tipoSelecao=1&contexto=pq&selTab=tab1&submitLoad=true. Acedido a 2 de Julho de 2012.
- Laguerre, M.; Lecomte, J. & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244-282.
- Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Mateos, R.; & Espartero J. L. (2011). Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. *Food Chemistry*, **129**, 1169–1178.
- Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A. & Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 449-456.
- Malheiro, R.; Sá, O.; Pereira, E.; Aguiar, C.; Baptista, P. & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, **37**, 473– 478.

- Malik, N. S. A. & Bradford, J. M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, **110**, 274–278.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. & Jiménez, L. (2006). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal for Clinical Nutrition*, **79**, 727–47.
- Manna, C.; Migliardi, V.; Golino, P.; Scognamiglio.; Galletti, P.; Chiariello, M. & Zappia, V. (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 461-466.
- Marsilio, V.; Campestre, C. & Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55-60.
- Marsilio, V.; Seghetti, L.; Lannucci, E.; Russi, F.; Lanza, B. & Felicioni, M. (2005). Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of Science and Food Agricultural*, **85**, 1084–1090.
- Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C.; Garcia, A. & Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9817-9823.
- Montaño, A.; Sánchez, A. H.; Casado, F. J.; Castro, A. & Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, **82**, 297-302.
- MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G. & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 2046–2056.
- Norma Portuguesa (NP) 3034. (2012). *Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.*
- Nout, M. J. R. & Rombouts, F. M. (2000). Fermented and Acidified Plant Foods, in Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Nychas, G. J. E.; Panagou, M. L.; Waldron, K. W. & Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 173-177.

- O'Dowd, Y.; Driss, F.; Dang, P. M.-C.; Elbim, C.; Gougerot-Pocidallo, M.-A.; Pasquier, C. & El-Benna, J. (2004). Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, **68**, 2003–2008.
- Oliveira, I.; Sousa, A.; Morais, J. S.; Ferreira, I. C. F. R.; Bento, A.; Estevinho, L. & Pereira, J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 1801–1807.
- Oliveira, M.; Brito, D.; Catulo, L.; Leitão, F.; Gomes, L.; Silva, S.; Vilas-Boas, L.; Peito, A.; Fernandes, I.; Gordo, F. & Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*. **55**, 219-226.
- Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, **78**, 133-154.
- Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2000). Phenolics compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potencial of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, **38**, 647-659.
- Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 703-717.
- Panagou, E. Z. & Katsaboxakis, C. Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. *Food Microbiology*, **23**, 199-204.
- Panagou, E. Z.; Hondrodinou, O.; Mallouchos, A. & Nychas, G. J. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, **28**, 1301-1307.
- Parinos, C. S.; Stalikas, C. D.; Giannopoulos, T. S. & Pilidos, G. A. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, **145**, 339-343.
- Paudel, S.; Magradi, T. & Lamichhane, J. R. (2011). Antimicrobial activity of wild olive crude extracts *in vitro*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, **2**, 110-113.

- Pereira, A. P.; Ferreira, I. C. F. R.; Marcelino F.; Valentão P.; Andrade, P. B.; Seabra R.; Estevinho, L.; Bento A. & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, **12**, 1153-1162.
- Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J. L.; Alcludia, F.; Cert, A. & Mateos, R. (2009). Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, **115**, 86–91.
- Pereira, J. A.; Pereira, A. P. G.; Ferreira, I. C. F. R.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Seabra, R.; Estevinho, L. & Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8425–8431.
- Piga, A.; Del Caro, A.; Pinna, I. & Agabbio, M. (2005). Anthocyanin and colour evolution in naturally black table olives during anaerobic processing. *Food Science and Technology*, **38**, 425–429.
- Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. J. E. & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1190–1195.
- Psani, M. & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 1329-1336.
- Rejano, L.; Montaña, A.; Casado, F. J.; Sánchez, A. H. & Castro, A. (2010). Table Olives: Varieties and Variations. *Food Biotechnology Department*, Instituto de la Grasa CSIC, Seville, Spain, **1**, 5-15.
- Rencher, A.C. (1995). *Methods of multivariate analysis*. New York: Wiley.
- Roche, M.; Dufour, C.; Mora, N. & Dangles, O. (2005). Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **3**, 423-430.
- Rodríguez-Gómez, F.; Bautista-Gallego, J.; Romero-Gil, V.; Arroyo-López, F. N.; Garrido-Fernández, A. & García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, **46**, 56-63.

- Rodríguez, G.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R. & Jiménez, A. (2007). Antioxidant activity of effluent during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol from olive mill waste. *European Food Research and Technology*, **224**, 733-741.
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R. & Fernández-Bolaños, J. (2008). Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, **99**, 5261–5269.
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Jaramillo, S.; Fuentes-Alventosa, J. M.; Guillén, R.; Jiménez-Araujo, A.; Rodríguez- Arcos, R. & Fernández-Bolaños, J. (2009a). 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): an important phenolic compound present in natural table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6298–6304.
- Rodríguez, H.; Curiel, J. A.; Landete, J. M.; Rivas, B.; Felipe, F. L.; Gómez-Cordovés, C.; Mancheño, J. M. & Muñoz, R. (2009b). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **132**, 79–90.
- Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F. F. & Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivar of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 964-967.
- Romero, C. & Brenes, M. (2012). Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 9017-9022.
- Romero, C.; Brenes, M.; Garcia, P. & Garrido, A. (2002a). Hydroxytyrosol 4-a-D glucoside, an importante phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3835–3839.
- Romero, C.; Garcia, P.; Brenes, M.; Garcia, A. & Garrido, A. (2002b). Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*, **15**, 489–496.
- Romero, C.; Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; Garcia, A. & Garrido, A. (2004a). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 479-484.
- Romero, C.; Brenes, M.; García, P.; García, A. & Garrido, A. (2004b). Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1973-1979.

- Romero, M. P.; Tovar, M. J.; Girona, J. & Motilva, M. J. (2002c). Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5349-5354.
- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K. & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.. *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.
- Savarese, M.; Marco, E. & Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* Cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, 761-770.
- Siger, A.; Czubinski, J.; Kachlicki, P.; Dwiecki, K.; Lampart-Szczapa, E. & Nogala-Kalucka, M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, **25**, 190–197.
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Coelho, A. V. & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, **12**, 385–396.
- Simopoulos, A. (2001). The Mediterranean Diets: What is so important about the diet of Greece? The scientific evidence. *Journal of Nutrition*, **131**, 3065S-3073S.
- Singh, I.; Mok, M.; Christensen, A.; Turner, A. & Hawley, J. (2006). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **18**, 127-132.
- Sivakumar, G.; Bati, C. B. & Uccella, N. (2005). HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chemistry Natural Compounds*, **41**, 588–591.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, **15**, 71-81.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J. C. & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013-1023.
- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calheta, R. C.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. & Pereira, J. A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 8533-8538.

- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L., Bento, A. & Pereira, J. A. (2008). Antioxidant potential of traditional stoned table olives “*Alcaparras*”: influence of the solvent and temperature extraction conditions. *LWT – Food Science and Technology*, **41**, 739-745.
- Tapiero, H.; Tew, K. D.; Nguyen Ba, G. & Mathé, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**, 200-207.
- Tassou, C. C.; Panagou, E. Z. & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, **19**, 605-615.
- Tokuşoğlu, Ö; Alpas, H. & Bozoğlu, F. (2010). High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**, 250–258.
- Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Majo, D. D.; Gimmanco, S. & Guardia, M. L. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, **18**, 98–112.
- Uccella, N. (2001). Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trend in Food and Science & Technology*, **11**, 328-339.
- Vega Leal-Sánchez, M.; Ruiz-Barba, J. L.; Sánchez, A. H.; Rejano, L.; Jiménez-Díaz, R. & Garrido, A. (2003). Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*, **20**, 421–430
- Vinha, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B. M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B. P. P.; Seabra, R. M. & Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influence of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, **89**, 561-568.
- Vinha, A. F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Pereira, J. A. & Oliveira, M. B. P. P. (2002). Development and evaluation of an HPLC/DAD method for the analysis of phenolic compounds from olive fruit. *Journal Liquid Chromatography & Related Technologies*, **25**, 151-160.
- Visioli, F.; Poli, A. & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological, activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, **22**, 65-75.

