

**Diversidade de oliveiras do Vale do Côa: estabelecimento de  
grupos homogéneos para seleção recorrendo a diferentes  
ferramentas**

**Nuno Manuel Pires Ferreiro**

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

Orientado por

**Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues**

**Professora Doutora Paula Cristina Santos Baptista**

**Bragança**

**2021**

Este trabalho contou com o apoio financeiro do projeto “COA/BRB/0035/2019” OLIVECOA - Oliveiras centenárias do Vale do Côa: redescobrir o passado para valorizar o futuro financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal)



Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional

Aos meus pais

Aos meus avós

## **Agradecimentos**

O presente trabalho teve o contributo de diversas pessoas às quais deixo o sincero agradecimento pelo suporte e apoio para a sua realização e conclusão.

Ao Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues pelo incansável apoio prestado no decorrer do trabalho de campo e escrita deste trabalho, pelo constante incentivo, e conselhos prestados.

À Professora Doutora Paula Cristina Santos Baptista por todo o apoio prestado, pela ajuda e sugestões de melhoria para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira pelos bons ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade e por todo o apoio prestado na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Peres por todo o apoio prestado no tratamento de dados no programa R.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Rodrigues, Kevin Silva, Patrick Ferreira e Sandra Lamas por toda a ajuda prestada na colheita das amostras, na realização dos trabalhos experimentais e acima de tudo pela boa disposição que permitiram a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Ana Santos, Andreia Silva, Kevin Silva, Sandra Lamas por toda a resiliência, apoio, companheirismo e ajuda que prestaram ao longo da realização deste trabalho.

Á minha família por todo o suporte, por todo o esforço realizado, pelo incentivo e pelo constante apoio que permitiu a conclusão deste trabalho.

# Índice

1.	Introdução.....	10
2.	A oliveira e a composição dos seus azeites.....	15
2.1	Composição.....	15
2.1.1	Fração saponificável.....	15
2.1.2	Fração insaponificável.....	17
2.2	Sensorial.....	19
2.3	Qualidade.....	19
2.4	FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	21
3	Material e métodos.....	24
3.1	Identificação dos exemplares centenários.....	24
3.2	Amostragem.....	24
3.3	Extração.....	25
3.4	Análise Sensorial.....	25
3.5	Caracterização morfológica.....	26
3.6	Análise FTIR.....	27
3.7	Análise estatística.....	28
4	Resultados e discussão.....	30
4.1	Análise Sensorial.....	30
4.2	Caracterização morfológica.....	39
4.3	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	48
5	Conclusão.....	54
6	Bibliografia.....	55

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Distribuição mundial da área olivícola no ano 2019. Adaptado de: <a href="https://www.mapitstudio.com/product/wooden-world-map-oak-oiled/">https://www.mapitstudio.com/product/wooden-world-map-oak-oiled/</a> .....	10
<b>Figura 2</b> - Localização das parcelas selecionadas (símbolo amarelo) para estudo de oliveiras centenárias na região do Vale do Côa. Mapa obtido a 16 de janeiro de 2021 de <a href="https://earth.google.com/web/">https://earth.google.com/web/</a> .....	24
<b>Figura 3</b> - Amostragem do fruto (A - Colheita da azeitona; B - Armazenamento da azeitona).....	25
<b>Figura 4</b> - Extração de azeite em Abencor (A - Moenda; B - Termobatedura; C - Centrifugação; D - Decantação; E - Filtração). .....	25
<b>Figura 5</b> -FTIR (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) (A – Introdução da amostra no cristal; B – FTIR; C – FTIR e espectros). .....	27
<b>Figura 6</b> - Dendrogramas obtidos a partir das sensações olfativas e gustativas avaliadas nos azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.....	31
<b>Figura 7</b> - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com o perfil sensorial de azeites obtidos a partir de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.....	32
<b>Figura 8</b> - Boxplots do perfil sensorial (Sensações olfativas) encontrados em azeites extraídos de azeitonas de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilateral seguida pelo teste multicomparação de Tukey). .....	34
<b>Figura 9</b> - Boxplots do perfil sensorial (amargo, picante e doce) encontrados em azeites extraídos de azeitonas de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilateral seguida pelo teste multicomparação de Tukey). .....	36
<b>Figura 10</b> - Boxplots do perfil sensorial (Sensações gustativas) encontrados em azeites extraídos de azeitonas de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilateral seguida pelo teste multicomparação de Tukey). .....	38
<b>Figura 11</b> - Dendrogramas obtido dos parâmetros morfológicos de frutos e endocarpos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.....	40

<b>Figura 12</b> - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com os parâmetros morfológicos de frutos e endocarpos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. ....	41
<b>Figura 13</b> - Dendrogramas obtidos dos sinais obtidos por FTIR em azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.....	49
<b>Figura 14</b> - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com os sinais por FTIR em azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. ....	50
<b>Figura 15</b> – Numero de amostras reunidas através da sobreposição dos dendrogramas.....	52

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Limites estabelecidos para a composição de um azeite em ácidos gordos... 16	
<b>Tabela 2</b> - Limites estabelecidos para a composição esterólica de um azeite virgem extra. ....	18
<b>Tabela 3</b> - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros morfológicos avaliados nos frutos dos diferentes grupos.....	44
<b>Tabela 4</b> - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros morfológicos avaliados nos endocarpos dos diferentes grupos.....	47

## Resumo

A oliveira é uma das principais culturas da bacia do mediterrânico, encontrando-se difundida por outras regiões do mundo, mas em menor dimensão. Em Portugal, esta cultura tem um grande impacto socioeconómico, sobretudo nas regiões do interior. O Vale do Côa, é conhecido mundialmente pelo seu património de arte rupestre. Este Vale é rico também em património genético vegetal do qual a oliveira faz parte. A paisagem desta região é caracterizada pela presença de olivais de sequeiro nos quais existe um número considerável de exemplares centenários que não se encontram caracterizados e são potencial fonte de azeites com qualidade diferenciada. No entanto, e na impossibilidade de se proceder à caracterização de todos os exemplares, é importante estabelecer ferramentas que permitam criar grupos homogéneos e assim diminuir o número de plantas a estudar. Nesse sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo estabelecer grupos homogéneos com níveis de similaridade elevados, tendo por base diferentes análises (morfológica dos frutos e endocarpos, perfil sensorial dos azeites e espectros de FTIR), por forma a reduzir o número de exemplares a estudar sem haver perda de informação. Assim, partiu-se de uma amostra inicial de 96 exemplares de oliveiras centenárias, onde se colheram frutos, que foram caracterizados morfológicamente, e se extraíram azeites, caracterizados sensorialmente, e onde se procedeu à análise por FTIR (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier). Na análise dos resultados recorreu-se à sua representação icónica em dendrogramas, criando diferentes grupos de plantas de acordo com a análise realizada. Nas diferentes avaliações foi possível criar cinco grupos de acordo com a similaridade dos resultados. Contudo, e apesar dos dendrogramas não apresentarem o mesmo número de amostras dentro de cada grupo nos diferentes parâmetros avaliados, foi possível estabelecer plantas comuns que coincidiram nos diferentes grupos. Quando sobrepostos, o dendrograma da análise sensorial e FTIR, foi possível constatar que 17 amostras se encontram no mesmo grupo o que permitiu a constituição de grupos homogéneos. Apesar da grande variabilidade existente foi possível o estabelecimento de grupos homogéneos, contudo sempre que possível, esta informação deverá ser complementada com outra como por exemplo o perfil genético da planta.

**Palavras-chave:** Oliveiras centenárias, Vale do Côa, azeite, valorização, características morfológicas e sensoriais.

## **Abstract**

The olive tree is one of the main crops in the Mediterranean basin, being widespread in other regions of the world, but smaller. In Portugal, this culture has a great socio-economic impact, especially in the interior regions. The Côa Valley is known worldwide for its rock art heritage. This valley is also rich in plant genetic heritage, of which the olive tree is a part. The landscape of this region is characterized by the presence of dry olive groves in which there is a considerable number of centennial old specimens that are not characterized and are a potential source of oils with differentiated quality. However, given the impossibility of proceeding with the characterization of all the specimens, it is important to establish tools that allow the creation of homogeneous groups and thus reduce the number of plants to be studied. In this sense, the main objective of this work was to establish homogeneous groups with high levels of similarity, based on different analyses (morphology of fruits and endocarps, sensory profile of oils and FTIR spectra), in order to reduce the number of centennial olive trees to study without loss of information. Thus, we started with an initial sample of 96 specimens of centenarian olive trees, where fruits were collected, which were morphologically characterized, and oils were extracted, sensorially characterized, and where we proceeded to analysis by FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). In the analysis of the results, its iconic representation in dendrograms was used, creating different groups of plants according to the analysis performed. In the different evaluations, it was possible to create five groups according to the similarity of the results. However, and despite the dendrograms not showing the same number of samples within each group in the different parameters evaluated, it was possible to establish common plants that coincided in the different groups. When the sensory analysis and FTIR dendrogram were superimposed, it was possible to verify that 17 samples are in the same group, which allowed the formation of homogeneous groups. Despite the great variability that exists, it was possible to establish homogeneous groups, however, whenever possible, this information should be complemented with other information such as the genetic profile of the plant.

**Keywords:** Centenarian olive trees, Côa Valley region, olive oil, valorisation, morphological and sensorial characteristics.



# Capítulo 1

## Introdução

## 1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore pertencente à família Oleaceae, género *Olea* e espécie *europaea*. Esta planta é uma das mais emblemáticas em todo o mundo encontrando-se assim dispersa, principalmente em regiões com condições edafo-climáticas semelhantes ao clima mediterrâneo (Kaniewski et al., 2012). Assim, é na bacia do Mediterrâneo que o cultivo da oliveira é praticado há milhares de anos, representando esta região cerca de 98% da superfície oleícola mundial (Rallo et al., 2018). Atualmente, esta cultura encontra-se difundida por várias regiões do continente Americano, e mais recentemente assistiu-se à sua introdução na África do Sul, Austrália e nalguns países asiáticos, como o Japão e China (Sebastiani & Busconi, 2017). O continente Europeu e Africano são os que apresentam uma maior área com esta cultura (FAO, 2019). Na figura 1 encontra-se representada a distribuição da oliveira ao nível mundial assim como a área de olival plantado.



**Figura 1** - Distribuição mundial da área olivícola no ano 2019. Adaptado de: <https://www.mapitstudio.com/product/wooden-world-map-oak-oiled/>

A Europa, em particular os estados membros da união europeia, apresenta aproximadamente 5,1 milhões de hectares de área de oliveira plantada, o que representa 64% da produção mundial (IOC, 2020). De entre os maiores produtores da União Europeia (EU), destaca-se a Espanha (responsável por 39% da produção mundial) seguida da Itália (11%), Grécia (10%) e Portugal (4%) (IOC, 2020). O setor oleícola representa

assim um forte componente no setor agrícola nacional, representando 95,5 milhões de euros e 1,36% do valor da produção agrícola portuguesa (IOC, 2017). A oliveira em Portugal tem também uma grande importância ao nível sociocultural e paisagístico, principalmente nas regiões do interior. O olival faz parte da paisagem e da identidade do nosso país. A beleza desta paisagem tem contribuído para o aumento do turismo associado ao sector do azeite, a que temos vindo a assistir durante a última década (Santos, 2018).

Para além de gerar benefícios adicionais para a economia, este aumento de turismo poderá contribuir para a fixação de pessoas nestas regiões do interior com problemas demográficos graves. Na atualidade, vários roteiros estão a ser criados onde são inseridos exemplares de oliveiras centenárias com elevado património do ponto de vista paisagístico.

Os olivais tradicionais representam uma grande parte da área olivícola da UE, incluindo Portugal (Duarte et al., 2008). A olivicultura tradicional pode ser descrita como um sistema de produção de baixa intensidade, associado a árvores velhas, cultivadas a uma baixa densidade e originando pequenos rendimentos. A intensificação da produção, pela plantação e/ou reconversão de olivais tradicionais por olivais intensivos e superintensivos, é uma estratégia que se tem vindo a adotar sobretudo na região do Alentejo no sentido de aumentar a eficiência produtiva (Neves et al., 2013). A região de Trás-os-Montes é restritiva à implementação deste modo de produção intensiva, sobretudo devido à estrutura minifundiária das explorações olivícolas. Desta forma, é crucial que os olivicultores desta região recorram a estratégias de diferenciação para não perderem a sua capacidade competitiva nos mercados externos e internos, face aos olivicultores com sistemas de produção mais intensivos. Um nicho a explorar neste âmbito poderá passar pela exploração e valorização de oliveiras centenárias, nas diferentes vertentes económica, social e ambiental.

As oliveiras centenárias são uma marca da paisagem associada ao olival tradicional em Trás-os-Montes. Contudo, a sua proteção ou mesmo exploração sustentável não é praticada. A exploração destas oliveiras centenárias poderá contribuir para o aumento da viabilidade dos sistemas de produção e para a valorização de produtos endógenos diferenciados e de qualidade mais adaptados aos sistemas minifundiários dominantes. A exploração do turismo no espaço rural, integrando atividades que irão da produção à transformação de produtos de oliveiras centenárias, passando pela

gastronomia, poderá adicionalmente constituir uma fonte de receitas interessante. A preservação das oliveiras centenárias, melhor adaptadas às condições agro-ecológicas, poderá também constituir uma importante reserva genética com potencial aplicação para futuros trabalhos de seleção e melhoramento de cultivares (Díez et al., 2011). Além disso, estas cultivares estão frequentemente associadas a práticas e usos ancestrais e, portanto, à riqueza do património cultural. A comercialização de produtos que transportam um pouco de história, a paisagem e o saber fazer tradicional é uma das melhores formas de valorizar economicamente os azeites de oliveiras centenárias. Estudos com o objetivo de identificar e caracterizar exemplares de oliveiras centenárias na região de Trás-os-Montes, bem como a nível nacional, são muito escassos. Tanto quanto é do nosso conhecimento, apenas um reduzido número de árvores centenárias da região Transmontana foi caracterizado em termos de características morfológicas e composição química dos azeites obtidos dos seus frutos. A análise morfológica do fruto, endocarpo e folha destas oliveiras centenárias permitiu identificar o endocarpo como o parâmetro morfológico mais diferenciador face a cultivares novas (Fernandes, 2014). Similarmente, Rodrigues et al. (2019), observou que os azeites destas oliveiras centenárias apresentavam teores em compostos fenólicos mais elevados face aos azeites provenientes de cultivares novas.

A região do Vale do Côa, é uma área que atualmente detém um grande património histórico, devido às gravuras legadas pelo impulso criador dos antepassados. Para além deste património histórico esta região possui extensos olivais por todo o seu território, com um significativo número de exemplares centenários. A valorização e a preservação destas oliveiras revestem-se de enorme importância, pelos benefícios ambientais (conservação do meio ambiente), económicos (unidades olivícolas lucrativas) e sociais (criação de comunidades agrícolas prósperas) que podem gerar nestas populações rurais do interior. Para isso, é necessário, contudo, primeiro conhecer este património oleícola.

A identificação e caracterização dessas oliveiras por ferramentas genéticas são morosas e dispendiosas, nesse sentido, na tentativa de evitar despendir tempo e dinheiro, a presente dissertação tem como objetivo proceder à caracterização dos azeites obtidos a partir de exemplares centenários com recurso à análise sensorial, análise morfológica e ao FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) como ferramentas rápidas para agrupar e classificar os azeites.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo fazer o agrupamento homogéneo de oliveiras centenárias do Vale do Côa com base nos resultados obtidos na análise sensorial, análise morfológica e ao FTIR com o objetivo de diminuir o número de amostras a serem classificadas geneticamente.

O trabalho encontra-se estruturado em quatro partes distintas, isto é, na próxima secção faz-se uma breve abordagem sobre a caracterização de oliveiras, a sua composição e atividade biológica, referindo-se também os trabalhos existentes no que respeita à caracterização de oliveiras centenárias (Capítulo 2). O terceiro capítulo é destinado ao material e métodos, sendo que no quarto capítulo são apresentados os resultados do presente trabalho, procedendo-se à sua discussão. Apresentam-se também, as conclusões (Capítulo 5) e apontam-se sugestões para a possível continuação do trabalho no futuro.

## Capítulo 2



**A oliveira e a composição dos seus azeites**

## **2. A oliveira e a composição dos seus azeites**

O azeite é muito apreciado pelo seu valor gastronómico, pelas características químicas, sensoriais e também pelas propriedades terapêuticas (Freitas, 2013). Por forma a comprovar todas estas características, o azeite deve ser analisado quanto aos seus parâmetros de qualidade, características organoléticas e composição química. A execução desta avaliação é fulcral quando se pretende comprovar a qualidade e potenciar a diferenciação de um azeite.

### **2.1 Composição**

A composição do azeite está diretamente dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos da azeitona, nomeadamente da cultivar e estado de maturação, do processo de produção, tais como rega, fertilização, poda, mas também do tipo de colheita, transporte e armazenamento da azeitona, e finalmente do processo de extração e tipo de equipamentos utilizados, condições de armazenamento e transporte do azeite (Beltrán et al., 2010; Cayuela & García, 2017; Kalogeropoulos & Tsimidou, 2014).

A composição do azeite divide-se em duas frações, a fração saponificável e a fração menor (insaponificável) (Farràs et al., 2020).

#### **2.1.1 Fração saponificável**

A fração saponificável representa 98-99% do peso total do azeite, tendo esta como principais componentes os triglicéridos, ácidos gordos livres e constituintes menores como os fosfolípidos e glicósidos (Planell et al., 2014).

Os triglicéridos são tri-ésteres que resultam da combinação do glicerol com ácidos gordos, e são os principais componentes do azeite (Jimenez-Lopez et al., 2020). OOO Trioleína, POO Palmitodioleína e OOL Linoleodioleína, são os triglicéridos mais abundantes podendo representar no conjunto 60-90% do peso do azeite (Boskou, 2006; Jimenez-Lopez et al., 2020).

Os ácidos gordos presentes no azeite em maiores quantidades são o palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico, linoléico e linolênico. O mirístico, os ácidos heptadecanóico e eicosanóico, também são encontrados nos azeites mas em pequenas quantidades (Boskou, 2006). A composição do azeite em ácidos gordos deve obedecer

aos limites estabelecidos no Regulamento Delegado (UE) N° 1830/2015, e cujos valores se encontram indicados na tabela 1.

**Tabela 1** - Limites estabelecidos para a composição de um azeite em ácidos

<b>Nome Comum</b>	<b>Nomenclatura abreviada</b>	<b>Limite (%)</b>
<b>Mirístico</b>	C <sub>14:0</sub>	≤ 0,03
<b>Palmitico</b>	C <sub>16:0</sub>	7,5-20
<b>Palmitoleico</b>	C <sub>16:1</sub>	0,3-3,5
<b>Haptadecanóico</b>	C <sub>17:0</sub>	≤ 0,3
<b>Estearico</b>	C <sub>18:0</sub>	0,5 - 5,0
<b>Oleico</b>	C <sub>18:1</sub>	55 - 83
<b>Linoleico</b>	C <sub>18:2</sub>	3,5 - 21
<b>Linolénico</b>	C <sub>18:3</sub>	≤ 1,0
<b>Araquidónico</b>	C <sub>20:0</sub>	≤ 0,6
<b>Eicosenóico</b>	C <sub>20:1</sub>	≤ 0,4
<b>Beénico</b>	C <sub>22:0</sub>	≤ 0,2*
<b>Lignocérico</b>	C <sub>24:0</sub>	≤ 0,2

\*O limite aumenta para ≤ 0,3 no caso dos óleos de bagaço de azeitona.

Fonte: Regulamento Delegado (UE) N° 1830/2015

A composição em ácidos gordos pode diferir de amostra para amostra dependendo da zona geográfica de produção (em especial da latitude), do clima, cultivar e estado de maturação da azeitona (Boskou, 2006). Por exemplo, os azeites provenientes da Grécia, Itália e Espanha geralmente têm baixo teor em ácidos linoleico e palmítico e têm alto teor em ácido oleico (Boskou, 2006). Já os azeites provenientes da Tunísia são ricos nos ácidos linoleico e palmítico e inferior em ácido oleico (Boskou, 2006). Com base na análise de ácidos gordos em amostras de vários países, foi proposta a classificação dos azeites em dois tipos: azeites com baixo teor linoleico-palmítico e alto teor de ácido oleico; e azeites com alto teor de linoleico-palmítico e baixo teor de ácido oleico (Boskou, 2006).

Recentemente, Rodrigues (2018) verificou que a cultivar exerce igualmente uma forte influência sobre a composição em ácidos gordos. Este autor, ao estudar o perfil em ácidos gordos de azeite proveniente de oliveiras centenárias e de cultivares autóctones de Trás-os-Montes (Lentisca, Madural, Redondal, Rebolã, Verdeal e Verdeal Trasmontana) verificou que as cultivares Redondal e Verdeal Trasmontana foram as que apresentaram maior conteúdo em ácido oleico, por oposição à cultivar Madural. Ainda neste estudo, foi observado uma forte influência do ano de colheita sobre a composição em ácidos gordos, em particular nos conteúdos de ácido oleico e linoleico, tendo sido sugerido pelo autor estar relacionado com diferenças das condições climáticas entre os anos em estudo.

### 2.1.2 Fração insaponificável

A fração insaponificável é constituída por hidrocarbonetos, como o esqualeno e outros triterpénicos, mas também por tocoferóis, esteróis, compostos fenólicos, polifenóis e pigmentos (Planell et al., 2014).

Ao nível dos hidrocarbonetos, o esqualeno e o  $\beta$ -caroteno, são os que se encontram em maiores quantidades no azeite, podendo o primeiro composto constituir entre 60-75% dos hidrocarbonetos (Boskou, 2006). O esqualeno é o principal constituinte da fração insaponificável, podendo estar presente em concentrações entre 0,8 e 12 g Kg<sup>-1</sup> no azeite virgem (Grigoriadou et al., 2007). Este composto é caracterizado pela alta estabilidade sob condições de auto-oxidação (Grigoriadou et al., 2007).

Os tocoferóis e os tocotrienóis, são compostos constituintes da vitamina E. Existem quatro tipos de tocoferóis designados por alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ). O  $\alpha$ -tocoferol solúvel na gordura é aquele que apresenta a maior atividade biológica de vitamina E no azeite virgem (Kalogeropoulos & Tsimidou, 2014). A concentração deste composto no azeite virgem é geralmente entre 100-300 mg Kg<sup>-1</sup>, sendo os restantes tocoferóis encontrados em quantidades muito menores (Grigoriadou et al., 2007). Curiosamente, os azeites obtidos de oliveiras centenárias mostraram ser uma boa fonte de tocoferóis, bastando uma ingestão diária de 28,5-72,5 mL (dependendo da cultivar) deste azeite para garantir as necessidades diárias de vitamina E (Rodrigues et al., 2020b). Nestes azeites, a isoforma ( $\alpha$ ) foi identificada como sendo a predominante (Rodrigues et al., 2020b). Face a estes resultados, o mesmo autor propõe que a composição em tocoferóis possa servir como um marcador químico para identificar azeites provenientes de oliveiras centenárias. A cultivar centenária que apresentou maiores teores em tocoferóis foi a Lentisca, e consequentemente foi apontada pelo autor como a mais promissora do ponto de vista da saúde.

Os esteróis são lípidos que podem ser encontrados nos azeites na forma livre e na forma esterificada (Boskou, 2006). A forma de esterol mais abundante nos azeites virgem extra é o  $\beta$ -sitosterol, seguido por  $\Delta^5$ -avenasterol, campesterol, stigmasterol e colesterol (Özdemir et al., 2018). O Regulamento Delegado (UE) N° 1830/2015 estipula limites para a composição esterólica do azeite virgem extra, e cujos valores se encontram indicados na tabela 2. O teor e a composição de esteróis está diretamente relacionado com a

qualidade do azeite, uma vez que são utilizados para aferir a sua autenticidade. De acordo com Lukić et al. (2013) é possível identificar a cultivar e o grau de amadurecimento da azeitona pelo conteúdo de esteróis e triterpenóis nos azeites virgem.

**Tabela 2** - Limites estabelecidos para a composição esterólica de um azeite virgem extra.

<b>Ésteres</b>	<b>Limite (%)</b>
<b>Colesterol</b>	≤ 0,5
<b>Brassicasterol</b>	≤ 0,1
<b>Campesterol</b>	≤ 0,4
<b>Estigmasterol</b>	≤ Campesterol
<b>β-sitosterol aparente*</b>	≥ 93
<b>Delta-7-estigmatenol</b>	≤ 0,5
<b>Esteróis totais (mg/Kg)</b>	≥ 1000
<b>Eritrodiol e uvaol</b>	≤ 4,5

\*B-sitosterol aparente: (delta-5,23-estigmastadienol + colesterol + β-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol).

Fonte: Regulamento Delegado (UE) N° 1830/2015

A fração fenólica do azeite tem recebido especial atenção, devido aos benefícios que esta pode trazer à saúde do consumidor e também pelas características sensoriais que esta pode incrementar no azeite nomeadamente no amargo e picante. Os principais responsáveis por estas sensações são sobretudo o hidroxitirosol, tirosol e seus derivados, também lignanos e flavonóides (García-Villalba et al., 2010). De acordo com Regulamento (UE) n° 432/2012 e Autoridade europeia para a segurança alimentar (EFSA, 2012) é possível associar ao azeite alegações de saúde como: “redução do stresse oxidativo”, “propriedades antioxidantes”, “metabolismo lipídico”, desde que este contenha no mínimo 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (ex: oleuropeína e tirosol) por 20 g de azeite. Para garantir estes benefícios para a saúde, devem ser consumidas diariamente 5 mg dos compostos mencionados anteriormente (EFSA, 2012).

No estudo da fração fenólica de azeites provenientes de oliveiras centenárias, verificou-se que estes apresentam altos teores em compostos fenólicos ( $\geq 500$  mg tirosol  $\text{Kg}^{-1}$ ) (Rodrigues et al., 2019). O alto teor em compostos fenólicos verificado previne não só o stresse oxidativo, mas também doenças cancerígenas (Farràs et al., 2020). Assim, a utilização de alegações alimentares no rótulo de azeites provenientes de oliveiras centenárias seria uma boa aposta para a valorização deste produto.

## 2.2 Sensorial

Um dos fatores mais importantes na determinação da qualidade sensorial dos azeites virgens é o estado de maturação da azeitona (Jiménez Herrera et al., 2012). Este é um parâmetro muito relevante para determinar a qualidade organolética do azeite, dado que o impacto da fase de maturação do fruto na composição química do azeite é maior do que a própria cultivar (Bueno et al., 2006). Sendo a maturação um parâmetro importante, à medida que este aumenta ocorrem vários processos metabólicos que se refletem nas características sensoriais do azeite (Jiménez et al., 2013). Quando as azeitonas são colhidas numa fase inicial de maturação, o azeite obtido é mais amargo e picante, do que aquele que foi colhido num estado de maturação avançado (Bueno et al., 2006). O amargo e o picante são os atributos que mais são influenciados pela maturação, e fortemente associados aos polifenóis presentes nos azeites (Predieri et al., 2013; Bueno et al., 2006). Apesar do amargo e picante apresentarem uma forte ligação aos efeitos positivos na saúde, estes atributos ainda não são apreciados por uma grande parte dos consumidores. Porém, já existe um nicho de mercado (ex: *gourmet*) que tem vindo a demonstrar interesse por este tipo de características nos azeites, e encontram-se dispostos a pagar um preço *premium* por estes produtos (Predieri et al., 2013; Vitaglione et al., 2015). Similarmente, os azeites provenientes de oliveiras centenárias têm vindo a ser apontados como um produto com atributos sensoriais únicos podendo, por isso, vir a ocupar um lugar de destaque no mercado oleícola mundial. Do ponto de vista organolético estes azeites demonstram um perfil requintado, com notas raras como cereja verde (cvs. Lentisca e Madural), damasco (cvs. Lentisca, Madural e Verdeal Transmontana) e kiwi (cvs. Lentisca, Madural, Rebolã e Verdeal Transmontana) (Rodrigues et al., 2020a). Estes atributos positivos e diferenciadores, associado à maior riqueza de compostos fenólicos, faz destes azeites provenientes de oliveiras centenárias um produto de alto valor acrescido que poderá ter como destino mercados internos e externos exigentes.

## 2.3 Qualidade

A qualidade de um azeite é definida por vários parâmetros entre os quais se destacam a acidez livre, índice de peróxidos, espectrofotometria no ultravioleta, análise sensorial, ceras, entre outros, que ajudam a perceber a qualidade dos azeites. Existe regulamentação europeia que define limites para os parâmetros de qualidade em função

da categoria comercial [Regulamento (CEE) nº 2568/1991 no que respeita aos parâmetros de qualidade].

A qualidade dos azeites é condicionada por um enorme número de fatores que ocorrem durante a pré- e pós-colheita da azeitona. As práticas culturais, afetam a qualidade não só dos frutos mas também a qualidade final do azeite e incluem, por exemplo, a manutenção do solo, fertilizações e regas, os métodos de poda utilizados, controlo fitossanitário e sistema de cultivo (Rallo et al., 2018). As condições climáticas, podem também exercer influência na qualidade dos azeites. De acordo com García-Vico et al. (2017), as baixas temperaturas diminuem o conteúdo em compostos fenólicos. Já Tura et al. (2009) refere que em áreas frias, o conteúdo em compostos fenólicos aumenta com o aumento gradual da temperatura. Este autor verificou também que primaveras quentes e chuvosas e outonos chuvosos tinham um efeito positivo na composição volátil do azeite. Outros fatores que podem levar à perda de qualidade são os frutos atacados por pragas e ou doenças que provocam aumentos na acidez livre e nas absorvâncias ( $K_{232}$  e  $K_{270}$ ), o que impede os azeites de obterem uma categoria comercial superior (Malheiro et al., 2014). Além disso, a estabilidade à oxidação e a capacidade antioxidante diminuem devido à redução dos compostos fenólicos (Rallo et al., 2018). Algumas práticas antes da extração do azeite podem igualmente influenciar a sua qualidade, nomeadamente a altura e método de colheita da azeitona, e o seu transporte até ao lagar (Custódio, 2009). A data de colheita do fruto varia consoante a cultivar e as condições climáticas da região, devendo evitar-se colheitas muito tardias e conseqüentemente avançados estados de maturação, pois afetam negativamente a qualidade do azeite (Jimenez et al., 2015). De forma a se obter o máximo de qualidade é recomendável que cada região determine a época correta de colheita da azeitona.

Existem também fatores pós-colheita que afetam a qualidade do azeite, como todo o processamento tecnológico de extração (temperatura e tempo de termobatedura) e o seu posterior armazenamento (Custódio, 2009). No armazenamento é necessário garantir que o azeite se mantém ao abrigo da luz e do ar, isto para garantir que os limites dos parâmetros de qualidade asseguram a categoria comercial a que o azeite pertence.

Outro fator que influencia a qualidade do azeite é a cultivar. Esta influência não só o azeite, mas também as características do fruto que lhe dá origem, nomeadamente, as morfológicas e genéticas (Vergara-Barberán et al., 2015). Ou seja, a proteção e o controlo

das cultivares é outro fator relevante a ter em conta, dado que este influencia a qualidade do azeite.

## **2.4 FTIR (Fourier Transform Infrared Spetroscopy)**

A espectroscopia FTIR é um método muito utilizado atualmente, na caracterização de matrizes alimentares, sendo uma alternativa promissora e imperativa para o futuro, dado que minimiza o gasto de recursos para análises de genética e gera resultados fiáveis no espaço de tempo de 1 minuto, tem ainda uma elevada sensibilidade, resolução e proporciona uma análise não destrutiva da amostra. Com a globalização houve a necessidade de produzir mais alimentos e de os colocar à disposição no mercado (Valand et al., 2020). O FTIR (Transformada de Fourier Infravermelho) surge no mercado como uma técnica para deteção das adulterações e fraudes no azeite (Dalmia, 2015). Este facto foi impulsionador no que concerne às fraudes alimentares, no caso dos azeites, os de melhor qualidade (Azeites Virgem extra) são diluídos com óleos vegetais mais baratos. Porém, esta técnica quando combinada com análise multivariada permite prever o nível de adulteração de um dado alimento. Outra valência deste equipamento é a criação de uma “impressão digital” única, que permite que esta técnica seja usada na classificação ou agrupamento de diferentes amostras conhecidas e identificação de amostras desconhecidas (De Luca et al., 2011). Existem também já trabalhos com a utilização de FTIR para distinguir azeites provenientes de diferentes origens geográficas (Bendini et al., 2007) e diferentes cultivares genéticas (Lamas et al., 2021)(Gurdeniz et al., 2007). As desvantagens do equipamento são lideradas pela complexidade dos instrumentos e o seu elevado custo. De seguida são apresentados alguns artigos que recorrem à utilização de FTIR para caracterização de cultivares: (Bendini et al., 2007) efetuou um estudo acerca da aplicação do FTIR como ferramenta para controlar a origem geográfica e a qualidade de azeites virgens. (De Luca et al., 2011) efetuou um estudo recorrendo ao FTIR como ferramenta de agrupamento e classificação de cultivares marroquinas. (Gurdeniz et al., 2007) utilizou o FTIR também como ferramenta de classificação de vários cultivares e diferenciação de azeites monovarietais. (Tapp et al., 2003) efetuou um estudo com recurso à ferramenta FTIR para discriminação de azeites por país de origem, tendo verificado com sucesso essa possibilidade. Por fim, (Vergara-Barberán et al., 2015) utilizou a ferramenta FTIR juntamente com análise discriminativa para discriminar diferentes cultivares provenientes de Espanha, com uma eficácia discriminativa de 95%.

## 2.5 Caracterização morfológica e genética

Atualmente, grande parte das cultivares são caracterizadas de acordo com dois parâmetros, nomeadamente através da caracterização morfológica e a caracterização genética (Trujillo et al., 2014). A caracterização morfológica requer uma análise dos frutos e dos respetivos endocarpos. A UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) estabelece critérios e parâmetros a avaliar para efetuar a caracterização morfológica do fruto e do endocarpo, podendo ser classificados como quantitativos ou qualitativos. Os parâmetros quantitativos são: peso, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, comprimento e forma e os qualitativos são: simetria, posição do diâmetro transversal, ápice, base, entre outros. Este método permite o reconhecimento e diferenciação de cultivares de forma expedita e económica, enquanto que o método por identificação genética é mais preciso, mas requer equipamento adequado para o efeito e especialistas da área que o saibam manusear (Martínez et al., 2018). A caracterização genética é efetuada com recurso aos marcadores de ADN (marcadores moleculares) ou com recurso à reação em cadeia da polimerase (PCR) (Fernandes, 2014; Gomes et al., 2012). Estudos foram efetuados nesta área por (Fernandes, 2014) onde caracterizou cultivares provenientes de oliveiras centenárias, por (Peres et al., 2011) onde caracterizou cultivares de Trás-os-Montes, bem como (Reboredo-Rodríguez et al., 2018) caracterizou cultivares do nordeste de Espanha.

# Capítulo 3

An aerial photograph of a rural landscape. The foreground and middle ground are dominated by a hillside covered in a dense, organized grove of olive trees. The trees are planted in a grid-like pattern, creating a rhythmic texture across the slope. In the center of the grove, a small, simple house with a red roof and light-colored walls is visible. The background shows more rolling hills under a clear, pale blue sky. The overall scene depicts a well-maintained agricultural area in a hilly region.

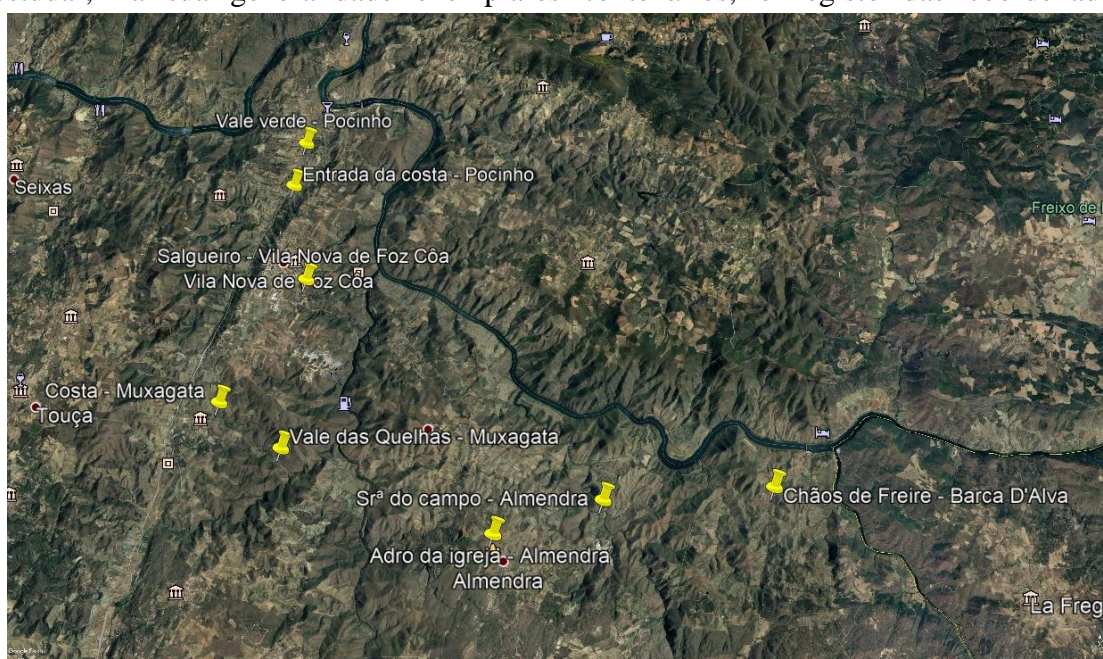
## Material e métodos

### 3 Material e métodos

#### 3.1 Identificação dos exemplares centenários

Para a realização do trabalho, efetuou-se uma prospeção da diversidade de oliveiras na região do Vale do Côa com o intuito de identificar e selecionar os exemplares de oliveiras a estudar. Os exemplares foram selecionados com base em parâmetros percecionados visualmente, tais como: dimensão do tronco e dimensão da copa.

Na Figura 2 estão indicadas as 8 parcelas que já foram selecionadas até ao momento. Em cada uma das parcelas, foi feita a marcação dos exemplares de oliveiras a estudar, na sua generalidade exemplares centenários, e registo das coordenadas



**Figura 2** - Localização das parcelas selecionadas (símbolo amarelo) para estudo de oliveiras centenárias na região do Vale do Côa. Mapa obtido a 16 de janeiro de 2021 de <https://earth.google.com/web/>

geográficas, com indicação do local e freguesia a que pertence a parcela. Procedeu-se à marcação de 96 oliveiras que foram caracterizadas.

#### 3.2 Amostragem

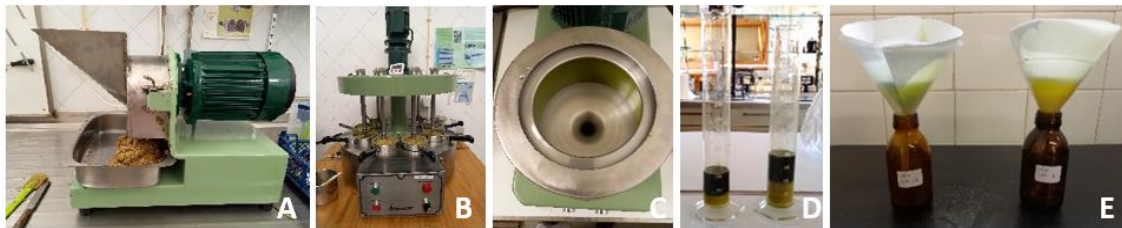
Foi efetuada colheita de azeitonas dos exemplares selecionados, para a extração de azeite. Para tal, foram colhidos aproximadamente 3kg de frutos por árvore que foram posteriormente utilizados para a extração do azeite como evidenciado na figura 3.



**Figura 3** - Amostragem do fruto (A - Colheita da azeitona; B - Armazenamento da azeitona).

### 3.3 Extração

A extração foi efetuada num lagar piloto Abencor (da Escola Superior Agrária de Castelo Branco), com três unidades principais: um moinho (figura4A), um termobatedor (figura4B) onde ocorre a malaxagem da pasta a 28°C e uma centrífuga que faz a separação sólido-líquido (bagaço-azeite e águas ruças) (figura4C). Após este processo, segue-se a decantação (figura4D) obtendo assim a separação líquido-líquido (azeite-águas ruças). Os azeites obtidos foram filtrados com sulfato de sódio anidro para remoção das partículas sólidas e absorção de alguma água que ainda possa estar presente (figura4E), e armazenados em garrafas de cor âmbar no escuro, até à sua análise.



**Figura 4** - Extração de azeite em Abencor (A - Moenda; B - Termobatedura; C - Centrifugação; D - Decantação; E - Filtração).

### 3.4 Análise Sensorial

Para determinação da categoria comercial e do perfil sensorial, cada amostra foi sujeita a um painel treinado da Escola Superior Agrária de Bragança utilizando por base as metodologias descritas pelo Regulamento de execução (UE) N° 2013/1348 da Comissão de Dezembro que altera o Regulamento n°2568/91/CEE e por (Rodrigues, et al., 2020a) para determinação do perfil descritivo. Nas provas sensoriais descritivas foram avaliados numa escala de 0 a 10, os descritores das sensações olfativas como por exemplo: sensações de frutado, sensações de frutos e sensações herbáceas. Foram também avaliadas as sensações gustativas como frutado, sabores de doce, amargo e picante,

sensações de frutos e sensações herbáceas. Finalmente foram avaliadas as sensações olfato gustativas como a complexidade e persistência. Para a realização desta análise foi utilizada uma folha de prova realizada de acordo com as normas dispostas pelo Conselho oleícola internacional (COI) (COI/ T.20/ Doc. 22 de novembro de 2005) com algumas alterações mencionadas por Rodrigues et al., 2020a. A prova foi realizada numa sala apropriada, com luz natural, temperatura ambiente e isenta de odores. Para a realização da prova foram utilizados copos oficiais de prova estabelecidos pelo Conselho oleícola internacional. Foi também disponibilizado aos provadores uma folha de registo, maçã cortada e água para lavar a boca entre amostras e cuspideiras.

### **3.5 Caracterização morfológica**

Foi caracterizado morfológicamente o fruto de cada árvore com base na avaliação de parâmetros biométricos, tendo sido avaliados 40 frutos de cada árvore escolhidos de forma aleatória. Todas as amostras de frutos e endocarpos foram avaliadas usando parâmetros biométricos definidos pelas diretrizes da União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas (UPOV) para *Olea europaea* (UPOV, 2011).

#### **3.5.1 Caracterização morfológica do fruto**

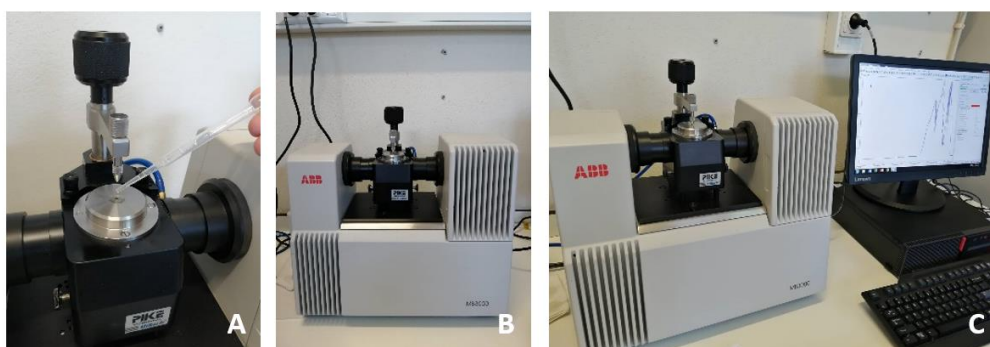
Nos frutos foram avaliados os seguintes parâmetros: peso (<2g baixo; 2-4g médio; 4-6g alto; >6g muito alto), comprimento (mm), diâmetro máximo (mm), diâmetro mínimo (mm), forma, simetria na posição A (Simétrico, Ligeiramente assimétrico ou assimétrico), posição do diâmetro transversal máximo na posição B (Junto à base, central ou junto ao ápice), ápice na posição A (Pontiagudo ou arredondado), base (truncada ou arredondada), mamilo (Evidente, pouco evidente ou ausente), presença de lentículas (pouco numerosas ou muito numerosas), dimensão das lentículas (pequenas ou grandes), localização inicial da viragem (a partir da base, uniformemente sobre toda a epiderme ou a partir do ápice) e cor em plena maturação (Negra ou outras). A forma do fruto foi calculada a partir da relação entre o comprimento / largura máximo, o que pode levar a uma classificação do formato do fruto como esférico (relação comprimento / largura <1,25), ovoide ( $1,25 \leq$  relação comprimento / largura  $\leq 1,45$ ) ou alongado (comprimento proporção / largura > 1,45).

### 3.5.2 Caracterização morfológica do endocarpo

No endocarpo foram determinados: peso (<0,3g baixo; 0,3-0,45g médio; 0,45-0,7g alto; >0,7g muito alto), comprimento (mm), diâmetro máximo (mm), diâmetro mínimo (mm), forma, simetria na posição A (Simétrico, Ligeiramente assimétrico ou assimétrico), na posição B (simétrico ou ligeiramente assimétrico), posição do diâmetro transversal máximo na posição B (Junto à base, central ou junto ao ápice), ápice na posição A (Pontiagudo ou arredondado), base (truncada, pontiaguda ou arredondada), superfície (lisa, rugosa ou muito rugosa), numero de sulcos fibrovasculares (<7 reduzido; 7-10 médio; >10 elevado), Distribuição dos sulcos fibrovasculares (uniforme ou agrupados nas proximidades), Extremidade do ápice (sem mucrão ou com mucrão a partir da base). A forma do fruto foi calculada a partir da relação entre o comprimento / largura máximo, o que pode levar a uma classificação do formato do fruto como esférico (relação comprimento / largura <1,4), ovoide ( $1,4 \leq$  relação comprimento / largura  $\leq 1,8$ ), elíptica ( $1,8 \leq$  relação comprimento / largura  $\leq 2,2$ ) ou alongado (comprimento proporção / largura > 2,2).

### 3.6 Análise FTIR

A análise de FTIR foi realizada com recurso a um MB300 FTIR de ABB (Zurique, Suíça), modo de reflexão (ATR) usando uma célula horizontal equipada com um cristal de diamante (figura 5). A aquisição de espectros foi feita em 32 scans  $\text{min}^{-1}$  a uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , sendo a faixa de leitura entre  $4000$  e  $500 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros foram adquiridos e tratados utilizando o software Horizon MB versão 3.4.



**Figura 5** -FTIR (Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) (A – Introdução da amostra no cristal; B – FTIR; C – FTIR e espectros).

### **3.7 Análise estatística**

Os dados foram tratados estatisticamente. Para cada tipo de dados (i.e., sensoriais, morfológicos, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier), estabeleceram-se grupos recorrendo a uma análise de agrupamento (ou de clusters). Esta análise é uma técnica exploratória multivariada de dados que permite classificar em grupos homogêneos um conjunto de dados (numéricos ou binários), com base nas similaridades ou dissimilaridades entre eles, podendo os grupos ser visualizados através de dendrogramas. Esta análise recorreu ao método de “ward.D2” (Murtagh et al., 2014) que pretende minimizar a variância dentro de cada grupo com o objetivo de encontrar grupos (clusters) compactos e esféricos. A existência de diferenças estatisticamente significativas entre grupos, para cada variável estudada, foi ainda avaliada recorrendo à análise de variância a um fator (one-way ANOVA). Quando diferenças significativas foram encontradas, recorreu-se ainda a testes de comparação múltipla (testes post-hoc), nomeadamente ao teste de Tukey. Recorreu-se ainda a diagramas de extremos e quartis (boxplots), para visualizar graficamente as diferenças encontradas. Todas as análises foram efetuadas para um nível de significância de 5%. O software de estatística R (open source), versão 2, foi usado para o tratamento dos dados (Murtagh & Legendre, 2014).

A photograph of two olive trees in a field. The trees are the central focus, with dense green foliage and thick, dark trunks. They are set against a bright blue sky with scattered white clouds. The foreground is filled with tall grass and small yellow wildflowers. A dark green arrow-shaped banner is positioned in the upper left corner, and a dark green rectangular banner is at the bottom.

## Capítulo 4

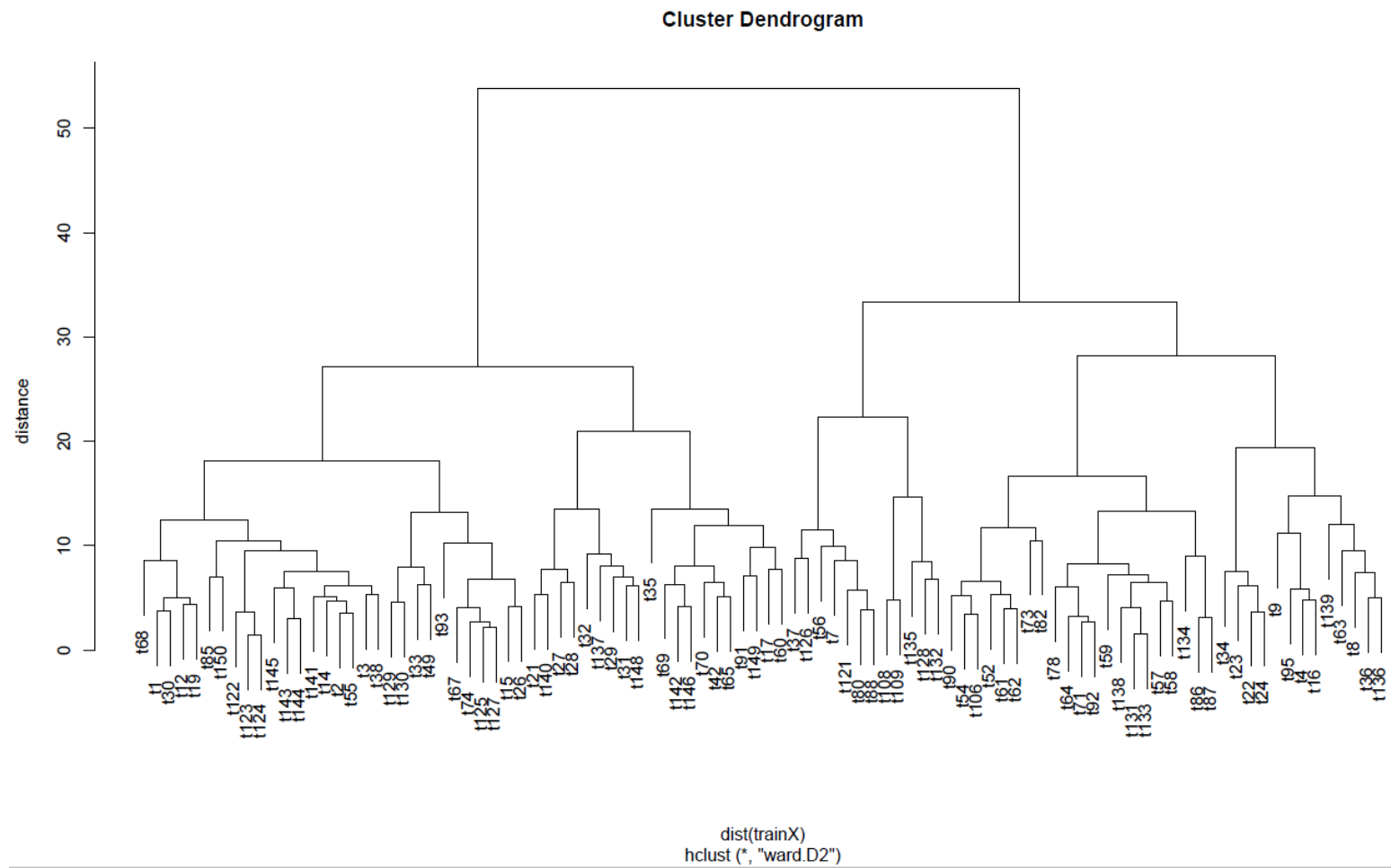
## Resultados e Discussão

## **4 Resultados e discussão**

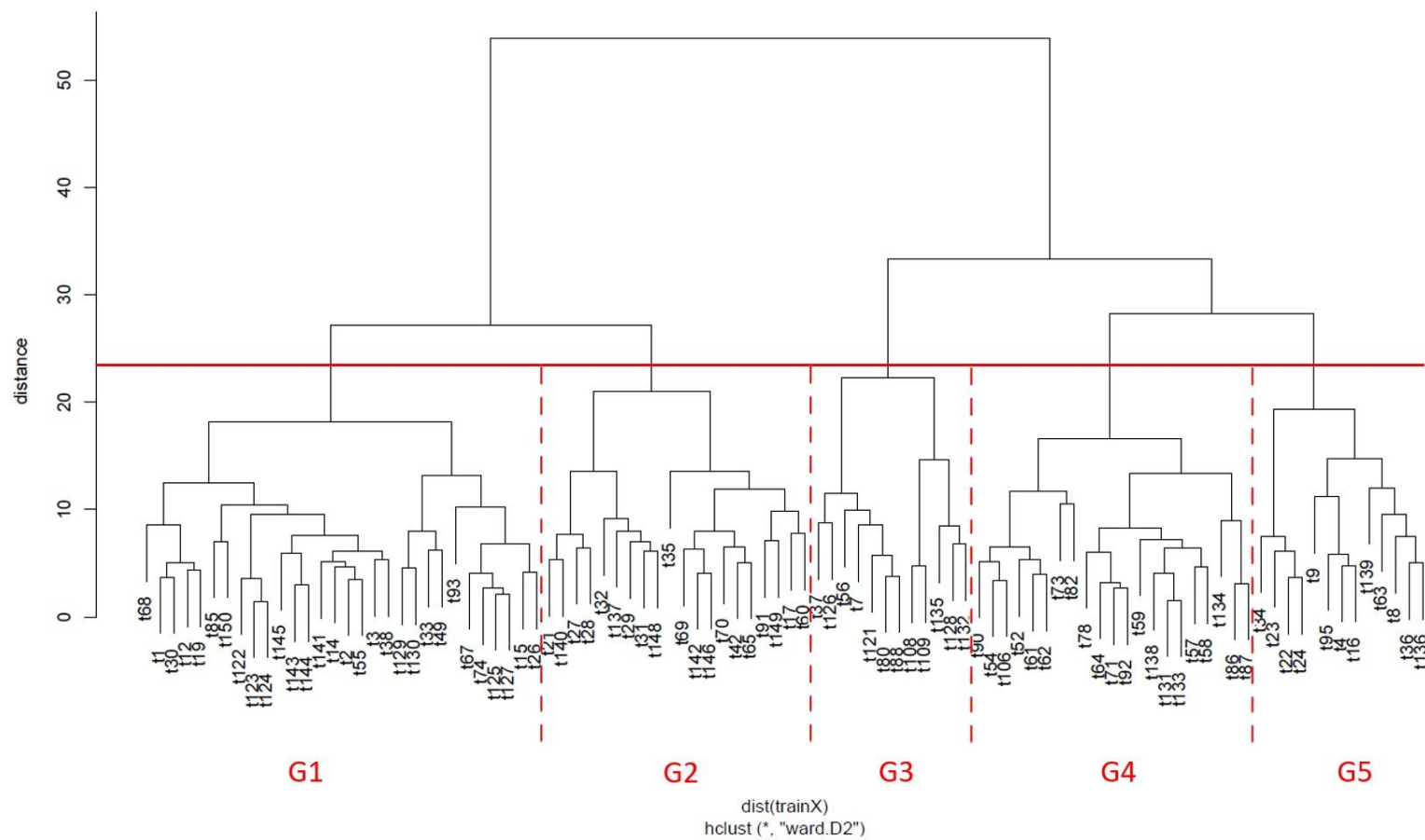
De forma a diminuir o número de amostras a serem futuramente caracterizadas geneticamente, vários parâmetros foram avaliados nos 96 azeites obtidos a partir de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Após tratamento estatístico pelo programa “R”, e com recurso a diagramas ou representação icónica que organiza determinados fatores e variáveis (Dendrogramas), foram criados diferentes grupos de plantas de acordo com a análise realizada. Foram feitos grupos com base na análise sensorial descritiva, com base na análise dos parâmetros morfológicos e com base nos resultados obtidos pela análise FTIR. O objetivo da aplicação desta ferramenta estatística foi agrupar plantas com características semelhantes de forma a diminuir o número total de exemplares a serem caracterizadas através de ferramentas genéticas, uma vez que estas ferramentas são muito dispendiosas e morosas. Para o agrupamento das árvores, foi tido em conta as semelhanças dos atributos avaliados no perfil sensorial, nos parâmetros morfológico e nos sinais obtidos no FTIR. No futuro, os presentes resultados serão confirmados com a caracterização genética.

### **4.1 Análise Sensorial**

Em cada um dos azeites foi determinado o perfil descritivo com recurso a uma folha de perfil sensorial com as recomendações estabelecidas pelo Conselho Oleícola Internacional (COI)(COI/ T.20/ Doc. 22 de novembro de 2005) com algumas alterações descritas por Rodrigues et al., 2020a. Em cada azeite foram avaliadas as sensações olfativas e as sensações gustativas. Nas sensações olfativas e gustativas foram avaliadas as sensações de frutado, as sensações de frutos e as sensações herbáceas assim como as respetivas intensidades para sensação percebida. Foram também avaliadas as sensações de doce, amargo e picante. Após o agrupamento de todos os dados representado em um dendrograma (figura 6), verificou-se que de acordo com o perfil sensorial, os azeites podem ser agrupados em 5 grupos distintos com uma distância de 24 ou seja, com um nível de similaridade de 86%. O grupo 1 é constituído por 30 amostras, o grupo 2 por 20 amostras, o grupo 3 por 12, o grupo 4 por 21 e o grupo 5 por 13 amostras conforme demonstrado na figura 7.

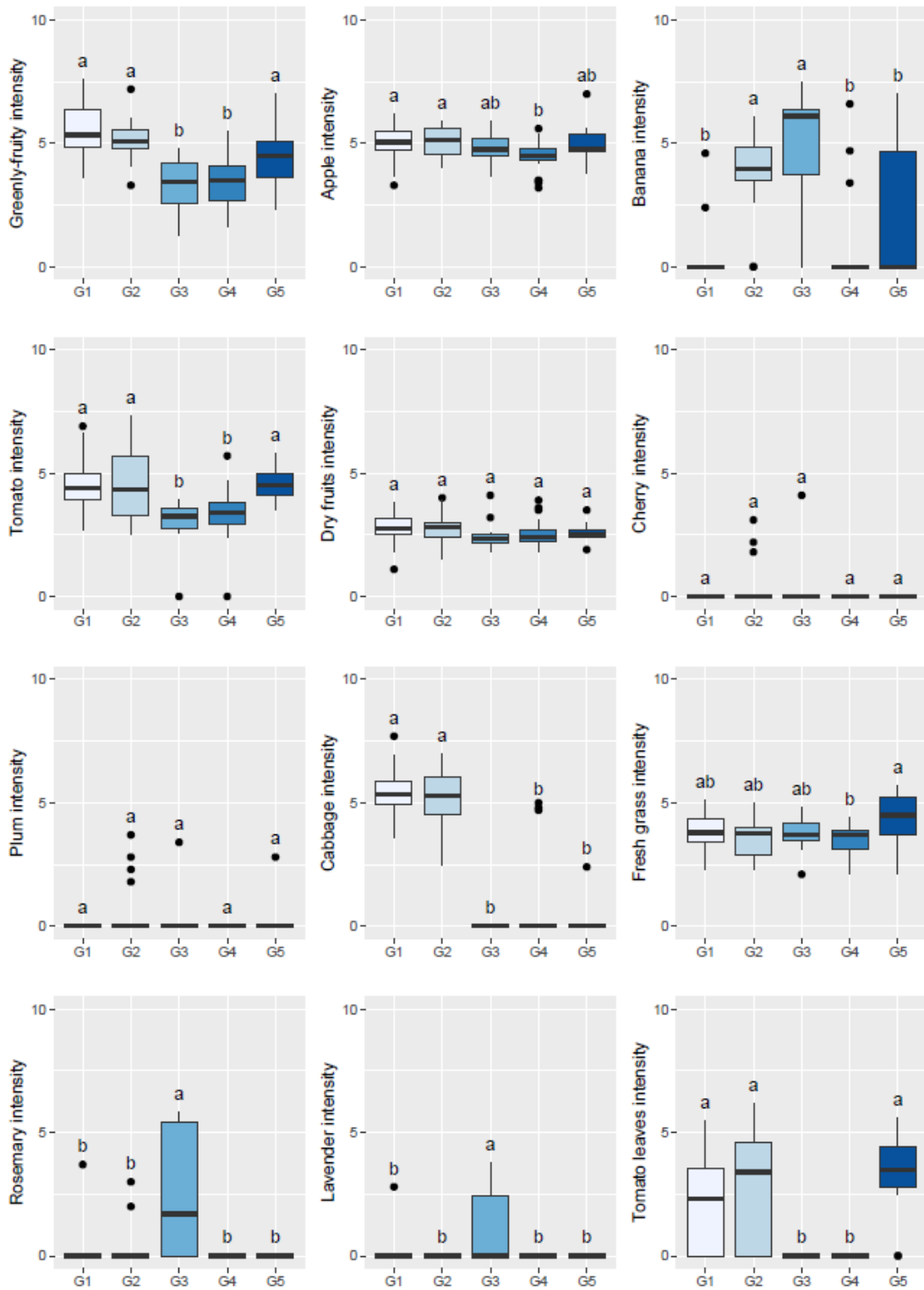


**Figura 6** - Dendrogramas obtidos a partir das sensações olfativas e gustativas avaliadas nos azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.



**Figura 7** - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com o perfil sensorial de azeites obtidos a partir de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.

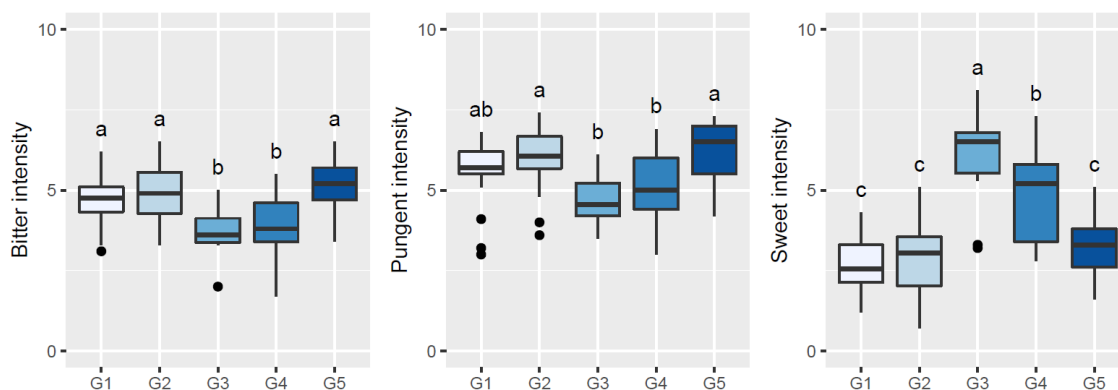
Relativamente às sensações percebidas, verificamos que cada grupo apresenta características distintas. Na figura 8, estão representados os boxplots relativos às sensações olfativas avaliadas na análise sensorial descritiva dos diferentes azeites. Relativamente ao frutado, verificou-se que todos os azeites apresentaram sensações de frutado verde com uma intensidade que variou de 3,4 e 5,3, sendo o grupo 3 o que apresentou menor intensidade e o grupo 1 aquele que apresentou maior. Do ponto de vista estatístico, verificou-se diferenças significativas entre os diferentes grupos de plantas. A variação da intensidade de frutado pode estar diretamente relacionada com diversos fatores, entre os quais o grau de maturação do fruto. De acordo com Gharby et al. 2018, verificou-se ao estudar o perfil sensorial de quatro cultivares cultivadas em marrocos que as cultivares picual e koroneiki apresentaram valores medianos de frutado verde superiores a 5,0 o que se assemelha aos valores obtidos pelo grupo 2. No que respeita às sensações de frutos, foram encontradas e quantificadas sensações de maçã, banana, tomate, frutos secos, cereja e ameixa. De todos os atributos avaliados, a maçã foi a que apresentou maior intensidade de percepção olfativa destacando-se nos grupos 1 e 2 com intensidade de 5,1 e 5,2 respetivamente. Nos restantes grupos, foram observadas diferenças significativas com principal destaque para o grupo 4 que foi o que apresentou menor intensidade de maçã (4,5). Na sensação de banana, verificou-se que esta apareceu apenas nos grupos 2 e 3 com intensidades que variaram de 3,9 a 6,1. Relativamente à sensação de tomate, verificou-se que esta sensação apresentou uma intensidade que variou de 3,3 e 4,5 sendo os grupos 3 e 4 os que apresentaram menor intensidade e os grupos 1, 2 e 5 os que apresentaram maior. Quanto aos frutos secos a presença entre estes foi muito semelhante, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos. Resultados semelhantes foram descritos por Rodrigues, et al. 2020a no estudo dos azeites provenientes de oliveiras centenárias. De acordo com o autor, o atributo de frutos secos foi também detetado em todos os azeites sendo que a cultivar redondal apresentou um valor médio de 2,4. Já (Hassine et al., 2015), apresentou valores semelhantes obtidos no estudo que caracteriza cultivares autóctones da Tunísia referindo também que o perfil sensorial varia de acordo com a cultivar. No que respeita à sensação de cereja não foram observadas diferenças significativas entre grupos sendo todos os grupos apresentaram uma mediana igual a zero. O mesmo foi observado na sensação de ameixa, onde todos os grupos apresentaram uma mediana igual a zero.



**Figura 8** - Boxplots do perfil sensorial (Sensações olfativas) encontrados em azeites extraídos de oliveiras de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilateral seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

Em relação aos atributos herbáceos, foram encontradas sensações de couve, erva fresca, rosmaninho, lavanda e folhas de rama de tomate. Relativamente às sensações de couve, verificou-se que este atributo foi percebido apenas nos grupos 1 e 2 com uma intensidade de 5,3, os restantes grupos apresentaram uma mediana de intensidade de 0. Já nas sensações de erva fresca, verificou-se a presença em todos os grupos, com uma intensidade que variou de 3,7 (grupo 4) a 4,5 (grupo 5). De acordo com Rodrigues, et al. 2020a, a erva fresca é uma sensação olfativa presente nos azeites que é comum a todas as cultivares analisadas pelo autor. Quanto ao rosmaninho, verificou-se a presença deste no grupo 3 com uma intensidade de 1,7. Já a sensação de lavanda, foi observada em menor intensidade com principal destaque no grupo 3. Em relação à sensação de folha de rama de tomate, verificou-se que a sua intensidade variou de 2,3 a 3,5. Observou-se também que os grupos 3 e 4 não foi percebida as sensações de folha de rama de tomate. De acordo com Rodrigues, et al. 2020a, no estudo de azeites obtidos de oliveiras centenárias verificou que a cultivar Rebolã foi a que apresenta valores médios mais baixos na presença olfativa de folhas de rama de tomate (1,6). Relativamente à harmonia dos azeites, esta variou de 7,7 a 8,1 não tendo sido observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Em relação às sensações gustativas, verificou-se tal como nas sensações olfativas que estas variaram entre os diferentes grupos. Em relação às sensações amargo, picante e doce (figura 9), observou-se que estas variam a sua intensidade de acordo com o grupo onde estão inseridos. No que respeita ao amargo, os dados obtidos mostram que este variou de 3,6 a 5,2 sendo que entre os grupos 1, 2 e 5 não foram verificadas diferenças significativas.

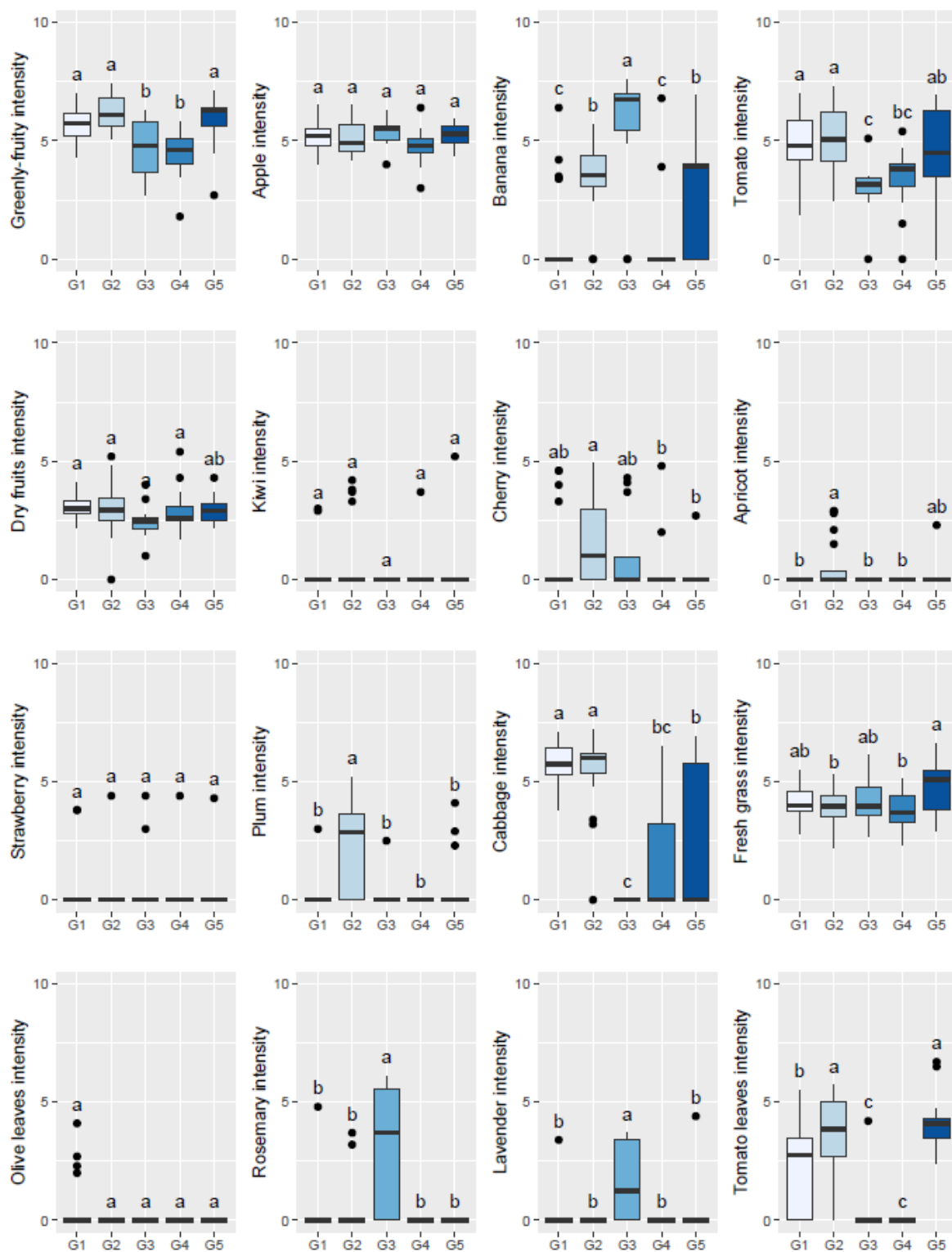


**Figura 9** - Boxplots do perfil sensorial (amargo, picante e doce) encontrados em azeites extraídos de azeitonas de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilateral seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

Em relação ao picante, verificou-se que a sua intensidade variou de 4,5 e 6,5 sendo que o grupo 3 foi o que apresentou intensidade de picante mais baixo e o grupo 5 o que apresentou maior intensidade de picante. No que respeita ao picante, outros autores referem valores semelhantes aos obtidos nomeadamente Rodrigues et al. 2020a no estudo de diferentes azeites provenientes de oliveiras centenárias e Gharby et al. 2018, no estudo do perfil sensorial de quatro cultivares cultivadas em Marrocos verificou que os azeites da cv. Arbequina apresentaram valores semelhantes. Já a sensação de doce, variou a sua intensidade de 2,5 a 6,5 sendo o grupo 1 o que apresentou menor intensidade e o grupo 3 o que apresentou maior intensidade deste atributo. Os resultados mostram também que nos grupos onde foi observado maior intensidade de doce, são aqueles onde foram observados menor intensidade de amargo. Conclui-se também que os atributos de amargo e picante seguem a mesma tendência nos mesmos grupos.

Nos restantes atributos gustativos (figura 10), nomeadamente nas sensações de frutado, verificou-se que todos os azeites apresentaram sensações de frutado verde com uma intensidade que variou de 4,8 e 6,3. De todos os grupos estudados, relativamente a este atributo, observou-se que nos grupos 1, 2 e 5 não se verificaram diferenças significativas entre os grupos. Segundo Gharby et al. 2018, no estudo referido anteriormente, verificou que a cultivar Picual, apresentou valores semelhantes ao grupo 2 com uma intensidade de 6,5. No que respeita às sensações de frutos, foram encontradas e quantificadas sensações de maçã, banana, tomate, frutos secos, kiwi, cereja, alperce, morango e ameixa. Na sensação de maçã, verificou-se que a sua intensidade variou entre

4,8 e 5,5, contudo não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos relativamente a esta sensação. Relativamente à sensação de banana, verificou-se que a intensidade deste atributo variou entre 3,5 e 6,7 sendo o grupo 2 o que apresentou menor intensidade e o grupo 3 aquele que apresentou maior. Em relação à sensação de tomate verificou-se que existem diferenças significativas entre os grupos, variando esta sensação entre 3,1 a 5,0 sendo o grupo 3 o que apresentou menor intensidade e o grupo 2 o que apresentou maior intensidade. Na sensação de frutos secos não se verificaram diferenças significativas entre grupos, dado que a variação foi entre 2,4 e 3,0, sendo o grupo 3 aquele que apresentou menor intensidade e o grupo 1 aquele que apresentou maior. Nas sensações kiwi, damasco e morango não foram observadas diferenças significativas entre grupos, dado que a intensidade da mediana foi igual a 0 em todos os grupos. Na sensação de cereja o único grupo onde se verificou a presença deste atributo foi no grupo 2 com uma intensidade de 1,0. O mesmo se verificou na ameixa, apenas o grupo 2 manifestou presença deste atributo com uma intensidade igual a 2,8.

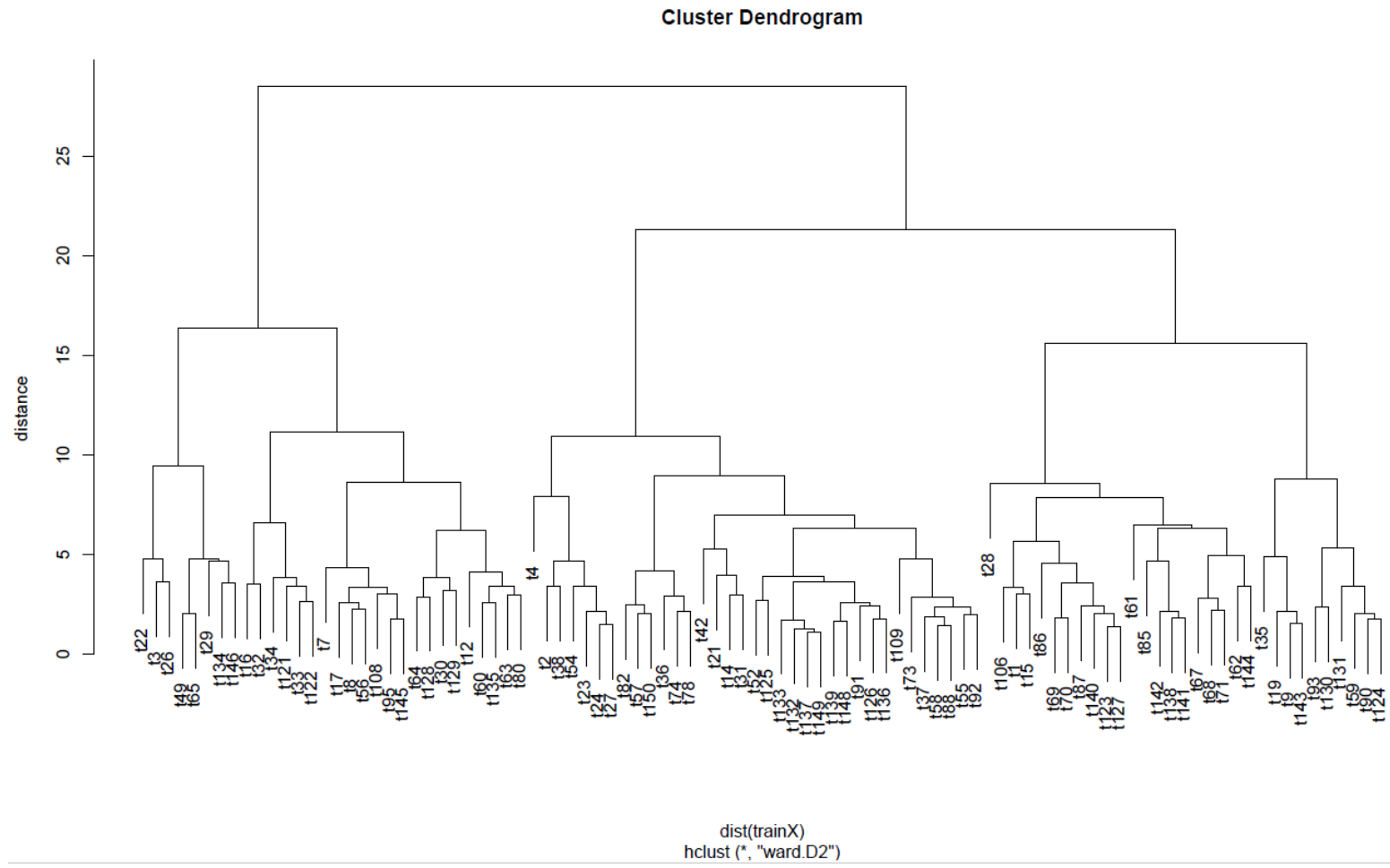


**Figura 10** - Boxplots do perfil sensorial (Sensações gustativas) encontrados em azeites extraídos de azeitonas de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas a um nível de significância de 5% (ANOVA unilaterial seguida pelo multicomparação de Tukey).

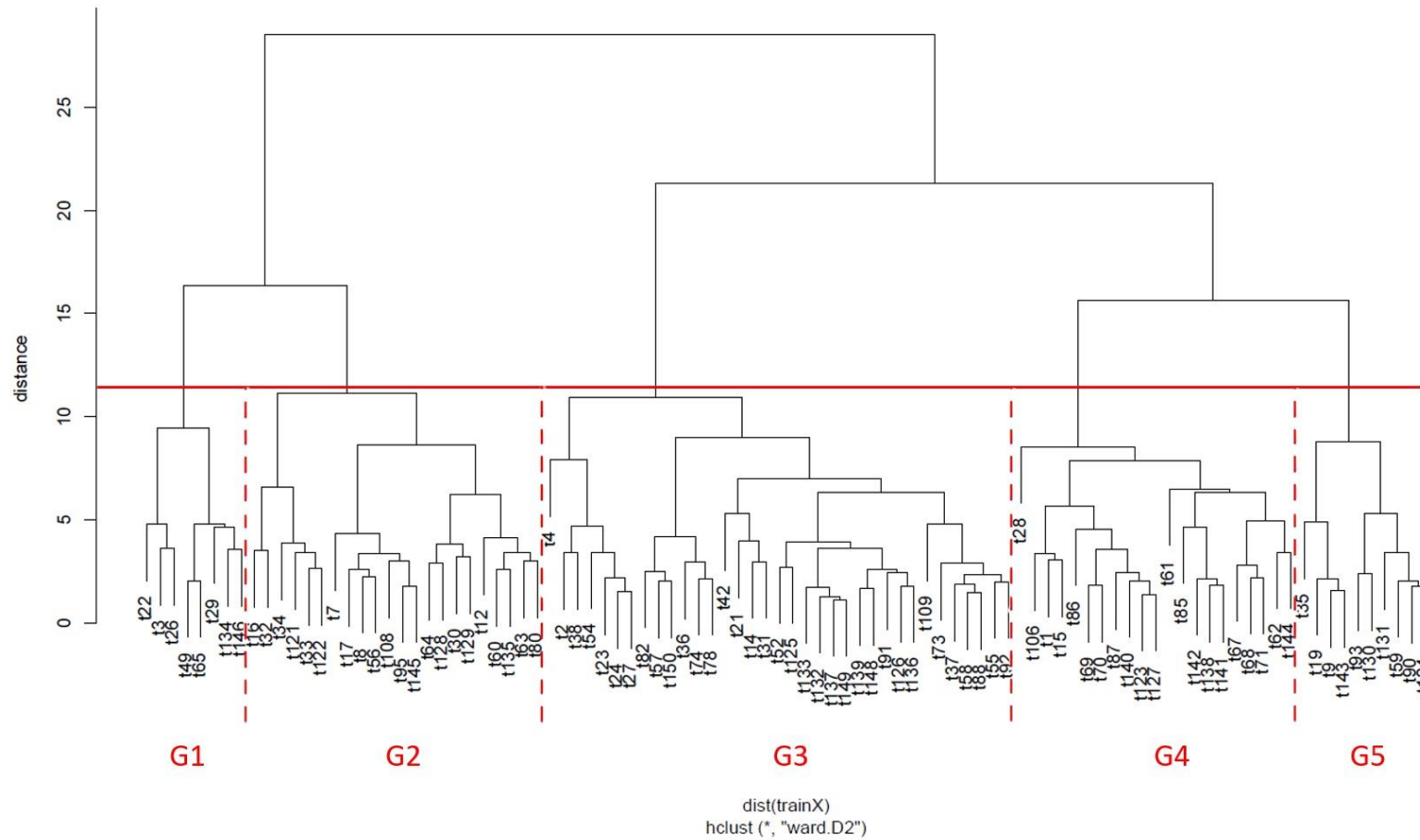
Nas sensações herbáceas (Figura 10), verificou-se a presença de sensações couve, erva fresca, folha de oliveira, rosmaninho e folha de rama de tomate. Na sensação de couve verificaram-se diferenças significativas entre grupos, sendo o grupo 1 e 2 o que apresentaram maior intensidade e o grupo 3 aquele que apresentou menor intensidade. Quanto à sensação erva fresca verificou-se que a intensidade variou entre 3,7 e 5,1, contudo não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos. O mesmo foi observado na sensação de folha de oliveira, onde não foram observadas diferenças significativas entre grupos. Na sensação a rosmaninho, verificou-se que o grupo 3 foi aquele onde se observou maior intensidade (3,7). O mesmo foi observado na sensação de lavanda onde apenas o grupo 3 manifestou presença deste atributo com intensidade de 1,3. Em relação à sensação folhas de rama de tomate verificaram-se diferenças significativas, entre os diferentes grupos com os grupos 2 e 5 a mostrar uma maior intensidade deste atributo e os grupos 3 e 4 com menor intensidade. Na determinação da complexidade e persistência, atributos que mostram a complexidade dos azeites ao nível do aroma e do sabor, verificou-se que todos os azeites apresentam uma elevada complexidade com valores que variaram de 6,1 e 6,6 não tendo sido observadas diferenças significativas entre dos diferentes grupos. Quanto à persistência verificou-se que todos os azeites são muito persistentes com intensidades que variaram entre 7,0 e 8,0. O grupo 4 foi o que apresentou menor intensidade e o grupo 2 foi o que apresentou maior intensidade. Resultados semelhantes foram observados por Tura et al. 2008, onde no estudo da influencia da cultivar em azeite virgem verificou que a cultivar é um fator que influencia a composição sensorial de um azeite, bem como outros fatores.

#### **4.2 Caracterização morfológica**

Para a determinação morfológica, foram seguidas as diretrizes da UPOV, 2011, onde foram, avaliados os parâmetros morfológicos de 40 frutos de cada planta e respectivos endocarpos. Os resultados obtidos na caracterização morfológica dos frutos e dos endocarpos permitiu o agrupamento das plantas tal como tinha sido feito com a avaliação sensorial. Na figura 11, encontra-se representado por um dendrograma de agrupamento com base nos dados obtidos onde podemos observar a formação de 5 grupos distintos a uma distância de 12, ou seja uma similaridade de 88 %. O grupo 1 é constituído por 8 amostras, o grupo 2 por 22 amostras, o grupo 3 por 35, o grupo 4 por 21 e o grupo 5 por 10 amostras conforme demonstrado na figura 12.



**Figura 11** - Dendrogramas obtido dos parâmetros morfológicos de frutos e endocarpos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.



**Figura 12** - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com os parâmetros morfológicos de frutos e endocarpos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.

Com base nos dendrogramas foi efetuado o agrupamento das plantas de acordo com as características morfológicas do fruto e do endocarpo. Na tabela 3, encontram-se descritas as características morfológicas dos frutos colhidos em diferentes oliveiras centenárias da região do Vale do Côa. Nos frutos foi avaliado o peso (g), diâmetro máximo (mm), diâmetro mínimo (mm), comprimento (mm), relação polpa caroço, forma, simetria (Posição A), diâmetro transversal máximo (Posição B), ápice, base, mamilo, presença de lentículas, dimensão das lentículas e localização inicial da viragem da coloração do fruto. Na avaliação do peso do fruto, verificou-se que este variou de 2,64 e 4,29, tendo sido observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos. Valores semelhantes aos do grupo 2 foram encontrados por Malheiro et al., 2015 para a cultivar Cobrançosa. Na determinação do diâmetro máximo (mm), verificou-se que este variou de 14,19 mm (grupo 2) a 18,02 mm (grupo 5), verificando-se uma diferença significativa entre os diferentes grupos. Valores semelhantes aos dos diferentes grupos foram encontrados por Malheiro et al., 2015 para as cultivares Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana. O mesmo efeito foi observado na determinação do diâmetro mínimo onde se verificou que grupo 1 foi aquele que apresentou um diâmetro mínimo mais baixo (5,22 mm) e o grupo 4 o maior (12,17 mm). Foram encontrados valores semelhantes aos do grupo 1 por Malheiro et al., 2015 relativamente a este parâmetro.

No que respeita ao comprimento, verificou-se que este variou de 18,75 a 21,62 mm, tendo o valor mais baixo sido observado no grupo 2 e o mais alto no grupo 5. É possível perceber que os valores obtidos pelos diferentes grupos são semelhantes aos valores obtidos por Malheiro et al., 2015 relativamente a este parâmetro. Quanto à relação polpa caroço, verificou-se que esta foi mais baixa no grupo 2 com um valor de 3,91 e mais alto no grupo 5 com um valor médio de 5,25. Relativamente à forma, verificou-se que esta foi ovoide na maioria dos grupos com exceção do grupo 5 que apresentou uma forma esférica. Quanto à forma, todos os grupos apresentaram valores muito homogêneos, sendo que todos foram muito semelhantes aos valores obtidos na cultivar negrinha de freixo num estudo das cultivares portuguesas efetuado por Peres et al., 2011.

Em relação à morfologia, verificou-se que na determinação da simetria na posição A, os grupos 1, 3 e 4 apresentaram uma conformação simétrica enquanto os grupos 2 e 5 apresentaram uma conformação ligeiramente assimétricos. Já no diâmetro transversal máximo na posição B, não se observaram diferenças entre os diferentes

grupos, apresentando uma posição máxima na parte central do fruto. Quanto ao ápice, verificou-se que os grupos 1,3 e 4 apresentaram conformação pontiaguda enquanto os grupos 2 e 5 apresentaram uma conformação arredondada. Já a base dos frutos dos diferentes grupos apresentação uma conformação truncada não tendo sido observadas diferenças entre os diferentes grupos. Em relação ao mamilo, verificou-se que os grupos 1 e 4 apresentaram mamilo evidente, os grupos 2 e 5 apresentaram mamilo ausente e o grupo 3 pouco evidente. Na avaliação da presença de lentículas verificou-se que todos os grupos apresentaram lentículas pouco numerosas e de pequena dimensão. Por fim na avaliação da localização inicial da viragem da coloração do fruto, todos os grupos demonstraram coloração uniforme sobre toda a epiderme.

Foi encontrado um estudo semelhante acerca da identificação fenotípica e genotípica de cultivares de oliveira em olivais Espanhóis por Reboredo-Rodríguez et al., 2018. Estudos efetuados por Barranco et al., 2000 demonstram a similaridade entre as cultivares “Oblonga” e “Frantoio” através das características morfológicas.

**Tabela 3** - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros morfológicos avaliados nos frutos dos diferentes grupos.

Grupo	Peso do fruto (g)	Diâmetro máximo (mm)	Diâmetro mínimo (mm)	Comprimento (mm)	Relação polpa/caroço	Forma	Simetria (Posição A)	Diâmetro transversal máximo (Posição B)	Ápice	Base	Mamilo	Presença de lentículas	Dimensão das lentículas	Localização inicial da viragem
G1	3,64 ± 0,72a	15,84 ± 1,41b	5,22 ± 1,14d	20,40 ± 2,02ab	4,36 ± 0,91ab	Ovóide	Simétrico	Central	Pontiagudo	Truncada	Evidente	Pouco numerosas	Pequenas	Uniformemente sobre toda a epiderme
G2	2,64 ± 0,38c	14,19 ± 1,04c	8,30 ± 0,94c	18,75 ± 1,49c	3,91 ± 0,70b	Ovóide	Ligeiramente assimétrico	Central	Arredondado	Truncada	Ausente	Pouco numerosas	Pequenas	Uniformemente sobre toda a epiderme
G3	3,05 ± 0,46b	14,30 ± 1,02c	10,38 ± 0,80b	19,75 ± 1,25b	4,16 ± 0,67b	Ovóide	Simétrico	Central	Pontiagudo	Truncada	Pouco evidente	Pouco numerosas	Pequenas	Uniformemente sobre toda a epiderme
G4	3,97 ± 0,57a	16,66 ± 0,95b	12,17 ± 1,05a	21,37 ± 1,07a	4,53 ± 0,75ab	Ovóide	Simétrico	Central	Pontiagudo	Truncada	Evidente	Pouco numerosas	Pequenas	Uniformemente sobre toda a epiderme
G5	4,29 ± 0,50a	18,02 ± 0,76a	9,55 ± 1,23b	21,62 ± 0,94a	5,25 ± 1,21a	Esférica	Ligeiramente assimétrico	Central	Arredondado	Truncada	Ausente	Pouco numerosas	Pequenas	Uniformemente sobre toda a epiderme
Valor de prova (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0004	----	----	----	----	----	----	----	----	----

\* Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre grupos, a um nível de significância de 5% (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey).

Na avaliação morfológica dos endocarpos (tabela 4), foi avaliado o peso (g), diâmetro máximo (mm), diâmetro mínimo (mm), comprimento (mm), forma, simetria (Posição A), simetria (Posição B), ápice, base, superfície, número de sulcos fibrovasculares, distribuição dos sulcos e a extremidade do ápice.

Na avaliação do peso do endocarpo, verificou-se que este variou de 0,54 g (grupo 2 a 0,73 g (grupo 4), tendo sido observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos verificando um peso médio de 0,65 g. Foram encontradas algumas semelhanças entre os valores obtidos nos pesos dos endocarpos dos diferentes grupos e um estudo de cultivares portuguesas efetuado por Peres et al. 2011. O grupo 1, 4 e 5 apresentaram semelhanças de peso com a cultivar Verdeal Transmontana, o grupo 2 com a cordovil e o grupo 3 com a madural. Na determinação do diâmetro máximo (mm), verificou-se que este variou de 7,61 mm (grupo 2) a 8,58 mm (grupo 4), verificando-se uma diferença significativa entre os diferentes grupos. Os grupos 1,4 e 5 apresentaram semelhanças com a cultivar verdeal transmontana e os grupos 2 e 3 apresentaram semelhanças com as cultivares cordovil e madural comparando os resultados com o estudo de Peres et al., 2011. O mesmo efeito foi observado na determinação do diâmetro mínimo onde se verificou que o grupo 1 foi aquele que apresentou um diâmetro mínimo mais baixo (2,26 mm) e o grupo 4 o maior (6,28 mm). Valores semelhantes foram encontrados por Peres et al. 2011 onde os valores obtidos no grupo 2 e 5 são similares aos valores obtidos na cultivar negrinha de freixo relativamente a este parâmetro. Os grupos 3 e 4 apresentaram semelhanças com os valores da cultivar Cobrançosa e madural do mesmo estudo. No que respeita ao comprimento, verificou-se que este variou de 14,34 e 15,52 mm, tendo o valor mais baixo sido observado no grupo 5 e o mais alto no grupo 4. Valores semelhantes aos obtidos foram encontrados no estudo de Peres et al. 2011, nas cultivares Cobrançosa, madural e negrinha de freixo. Quanto à forma verificou-se que o grupo 5 apresentou uma forma ovóide enquanto os restantes grupos apresentaram uma forma elíptica. Valores similares foram encontrados num estudo de Peres et al., 2011 em cultivares como a verdeal transmontana e cobrançosa.

Relativamente à simetria na posição A, verificou-se que o grupo 5 foi considerado ligeiramente assimétrico e todos os restantes grupos foram considerados ligeiramente simétricos. Já na avaliação da simetria na posição B, verificou-se que os grupos apresentaram uma simetria ligeiramente assimétrica com exceção do grupo 1 que

apresentou uma simetria simétrica. No que respeita à avaliação do ápice, verificou-se que todos os grupos apresentaram um ápice pontiagudo. Já a base dos endocarpos dos diferentes grupos, verificou-se que os grupos 3, 4 e 5 apresentaram uma base truncada enquanto os grupos 1 e 2 apresentaram uma base pontiaguda. Na avaliação da superfície dos endocarpos, verificou-se que em todos os grupos, os endocarpos apresentaram uma superfície rugosa com um número médio de sulcos fibrovasculares com uma distribuição de sulcos uniforme. Relativamente à extremidade do ápice, observou-se que os grupos 2, 3 e 5, apresentaram mucrão a partir da base enquanto os grupos 1 e 4 não apresentaram qualquer mucrão na extremidade do ápice.

Estudos relacionados com a caracterização de cultivares recorrendo à caracterização morfológica foram efetuados por Pinheiro & Esteves da Silva, 2005; Peres et al. 2011.

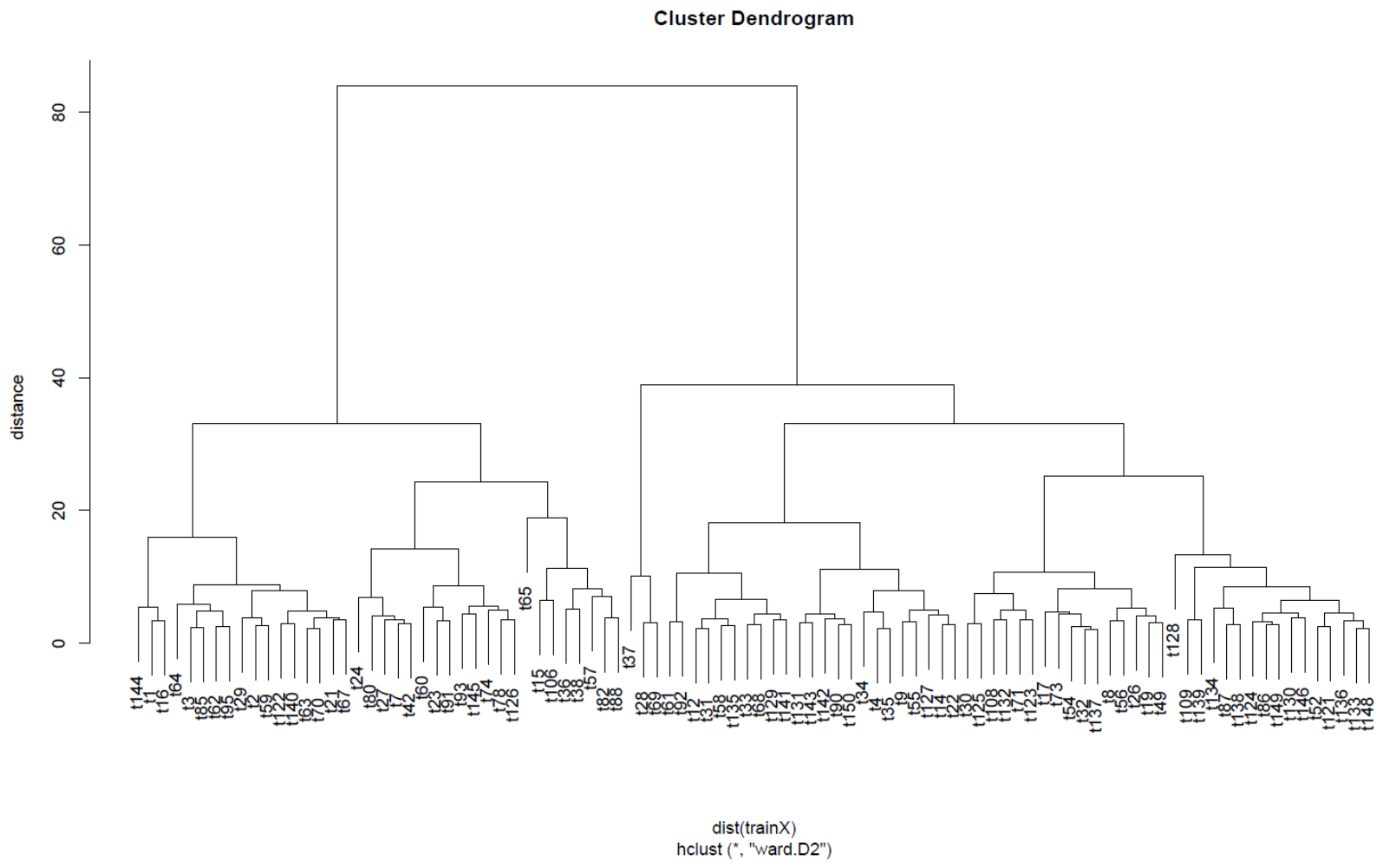
**Tabela 4** - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros morfológicos avaliados nos endocarpos dos diferentes grupos.

Grupo	Peso do endocarpo (g)	Diâmetro máximo (mm)	Diâmetro mínimo (mm)	Comprimento (mm)	Forma	Simetria (Posição A)	Simetria (Posição B)	Ápice	Base	Superfície	Número de sulcos fibrovasculares	Distribuição de sulcos fibrovasculares	Extremidade do ápice
G1	0,69 ± 0,14ab	8,35 ± 0,53ab	2,69 ± 0,62c	15,07 ± 1,44ab	Elíptica	simétrico	simétrico	Pontiagudo	Pontiaguda	Rugosa	Médio	Uniforme	Sem mucrão
G2	0,54 ± 0,08c	7,61 ± 0,50c	4,12 ± 1,05b	14,47 ± 1,02b	Elíptica	simétrico	Ligeiramente e assimétrico	Pontiagudo	Pontiaguda	Rugosa	Médio	Uniforme	Com mucrão a partir da base
G3	0,60 ± 0,10bc	7,83 ± 0,59bc	5,67 ± 0,63 <sup>a</sup>	15,39 ± 0,81a	Elíptica	Simétrico	Ligeiramente e assimétrico	Pontiagudo	Truncada	Rugosa	Médio	Uniforme	Com mucrão a partir da base
G4	0,73 ± 0,14a	8,58 ± 0,70a	6,28 ± 0,81a	15,52 ± 1,00a	Elíptica	Simétrico	Ligeiramente e assimétrico	Pontiagudo	Truncada	Rugosa	Médio	Uniforme	Sem mucrão
G5	0,70 ± 0,11ab	8,51 ± 0,47a	4,54 ± 0,84b	14,34 ± 0,62b	Ovóide	Ligeiramente assimétrico	Ligeiramente e assimétrico	Pontiagudo	Truncada	Rugosa	Médio	Uniforme	Com mucrão a partir da base
Valor de prova (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	----	---	----	----	----	----	----	----	----

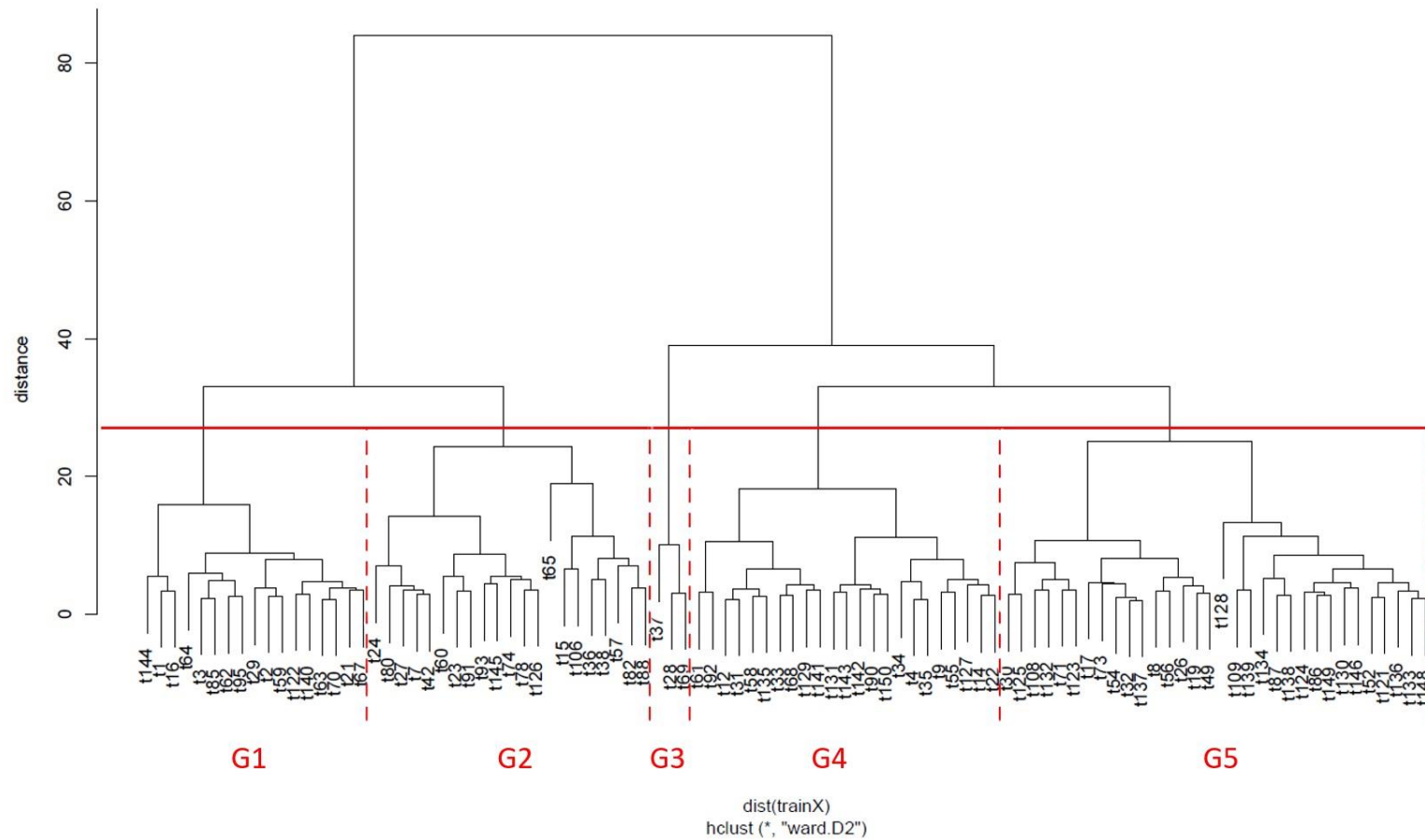
\* Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre grupos, a um nível de significância de 5% (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey).

### 4.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

O FTIR, é um método de caracterização físico para análise qualitativas e determinações quantitativas de traços de elementos. Estas determinações são possíveis porque os átomos que formam as moléculas possuem frequências específicas de vibração, que variam de acordo com a estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. Para varrer essa gama de frequência utiliza-se o infravermelho. A técnica de espectroscopia no infravermelho tem-se mostrado muito eficaz para a análise de diversos produtos alimentares, designadamente na determinação de gordura, proteína, humidade, fibras, açúcares, amido, entre outras. Por outro lado, permite ter acesso, de forma muito rápida e simultânea, a um vasto número de parâmetros analíticos, com grande reprodutibilidade e precisão, utilizando pequenos volumes de amostra. É uma técnica não destrutiva, e toda a informação obtida por esta técnica sobre a composição química do azeite, pode ser usada como uma ferramenta extremamente útil para o controlo e garantia da qualidade do produto, ao longo da linha de produção e durante o seu prazo de validade. Assim, quanto mais rápida for a determinação de um parâmetro de qualidade diferenciador (quer positivo quer negativo), mais cedo existe a possibilidade de atuar, quer numa eventual correção, quer na seleção de um produto de melhor qualidade. Para além das vantagens referidas, estas tecnologias são “amigas do ambiente”, visto que não envolvem o consumo de reagentes químicos dispendiosos e tóxicos, reduzindo desta forma os resíduos laboratoriais. No presente caso, o FTIR foi utilizado como ferramenta para o agrupamento de plantas de acordo com a similaridade do sinal obtido. Na figura 13 está representado um dendrograma de agrupamento com base nos dados obtidos na análise FTIR dos diferentes azeites. De acordo com os resultados obtidos, é possível formar 5 grupos distintos quando se observa a uma distância de 24 ou seja, com um nível de similaridade de 86%. O grupo 1 é constituído por 17 amostras, o grupo 2 por 21 amostras, o grupo 3 por 3, o grupo 4 por 23 e o grupo 5 por 32 amostras conforme demonstrado na figura 14.



**Figura 13** - Dendrogramas obtidos dos sinais obtidos por FTIR em azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa.

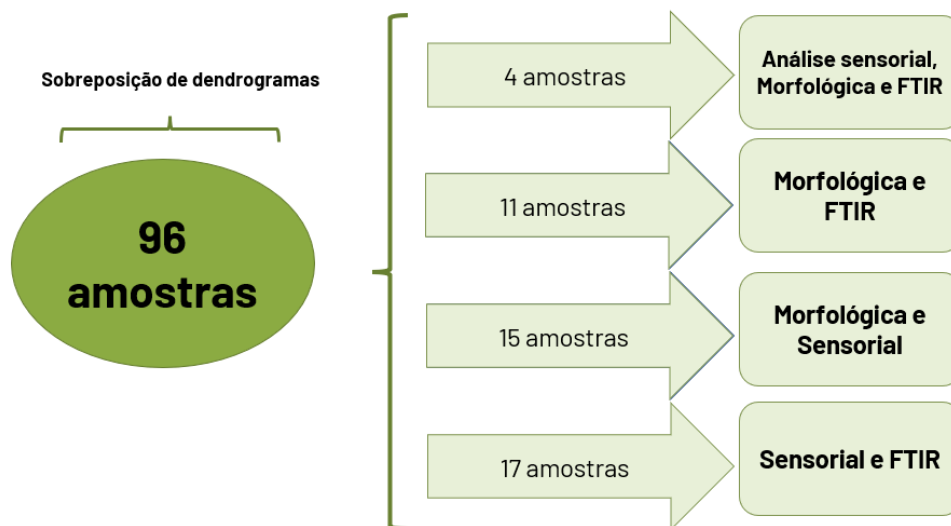


**Figura 14** - Dendrograma com identificação de grupos de acordo com os sinais por FTIR em azeites obtidos de oliveiras centenárias da região do Vale do Côa

O agrupamento dentro de cada dendrograma varia apresentando diferente número de amostras dentro de cada grupo. Contudo, tendo em consideração as diferentes ferramentas utilizadas para análise (análise sensorial, caracterização morfológica e FTIR) foi efetuada uma contabilização do número de amostras que estas ferramentas permitiram agrupar nos diferentes grupos.

Comparando as amostras presentes nos grupos de cada dendrograma (Figura 15), verificou-se que apenas 4 das 96 amostras se encontram reunidas no mesmo grupo nos três dendrogramas em simultâneo. Comparando as amostras presentes nos dendrogramas da caracterização morfológica e FTIR, verificou-se que 11 se encontram reunidas no mesmo grupo nos dois dendrogramas em simultâneo. Quando se compara o dendrograma da análise sensorial com o da caracterização morfológica verificou-se que o número de amostras reunidas aumentou, foi possível reunir 15 amostras no mesmo grupo em diferentes dendrogramas. As ferramentas que permitiram agrupar o maior número de amostras (17) no mesmo grupo em dendrogramas diferentes foram a análise sensorial e FTIR.

As amostras que foram agrupadas pelos dendrogramas verifica-se que estas não carecem todas de análise genética, pois já se sabe que pertencem a uma certa cultivar, dependendo do grupo a que pertencem. As restantes amostras que não foram agrupadas por nenhuma combinação de dendrogramas, carecem todas de análise genética para determinar a cultivar a que pertencem. A utilização desta metodologia como complemento à identificação de cultivares é muito útil dado que evita despender muito dinheiro em análises genéticas pois diminui significativamente o número de análises a realizar.



**Figura 15** - Número de amostras reunidas através da sobreposição dos dendrogramas.

# Capítulo 5

Conclusão

## **5 Conclusão**

No presente trabalho foram estabelecidos grupos homogêneos de plantas que foram agrupadas de acordo com as suas características recorrendo à análise de diferentes parâmetros, tais como caracterização morfológica do fruto e endocarpo, análise sensorial dos azeites e análise do azeite por FTIR.

A análise dos resultados separadamente por parâmetro avaliado, e construção de dendrogramas, permitiu a constituição de cinco grupos em cada um dos parâmetros. Contudo, esses grupos apenas coincidiram em parte, quando analisados os dados da avaliação sensorial em conjunto com FTIR, com uma coincidência de 17 amostras em grupos similares. Por sua vez a análise dos dados da caracterização morfológica dos frutos com o perfil de azeites obtidos por avaliação sensorial permitiu identificar 15 amostras em grupos similares.

Os resultados obtidos, apesar de promissores, não foram muito conclusivos no estabelecimento de grupos homogêneos comuns. Por outro lado, estes trabalhos devem ser complementados com outros para que se possam determinar ferramentas eficazes de trabalhar com amostras selecionadas e produtoras de azeites diferenciados.

## 6 Bibliografía

- Barranco, D., Trujillo, I., & Rallo, P. (2000). Are 'Oblonga' and 'Frantoio' Olives the Same Cultivar? *HortScience*, 35, 1323–1325. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.7.1323>
- Beltrán, G., Jiménez, A., del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L., Uceda, M., & Aguilera, M. P. (2010). Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.003>
- Bendini, A., Cerretani, L., Di Virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin, M., & Lercker, G. (2007). Preliminary evaluation of the application of the ftir spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, 30, 424–437. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00132.x>
- Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. (2006). Chapter 4: “Olive Oil Composition”, *Dimitrios Boskou “Olive Oil: Chemistry and Technology”*, Second Edition., 41-72, AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50008-0>
- Bueno, E. O., Expósito, M. J. M., Gordillo, C. de M., Cano, M. M., González, L. G., & Casas, J. S. (2006). Calidad sensorial de aceites de oliva virgen procedentes de variedades de aceitunas producidas en Extremadura. *Grasas y aceites*, 57, 313–318. ISSN: 0017-3495
- Cayuela, J. A., & García, J. F. (2017). Sorting olive oil based on alpha-tocopherol and total tocopherol content using near-infra-red spectroscopy (NIRS) analysis. *Journal of Food Engineering*, 202, 79 – 88. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.015>

- Custódio. (2009). FFUP - Azeites virgem extra comerciais: Composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade. Accessed October 2021. [https://sigarra.up.pt/ffup/en/pub\\_geral.pub\\_view?pi\\_pub\\_base\\_id=37304](https://sigarra.up.pt/ffup/en/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=37304)
- Dalmia, A. (2015). Rapid Measurement of Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Introduction Olive Pomace Oil with No Sample Preparation Using DSA/TOF. Copyright ©2015, PerkinElmer, Inc.
- De Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Oussama, A., Oliverio, F., Tauler, R., & Ragno, G. (2011). Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils. *Food Chemistry*, 124, 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.010>
- Díez, C. M., Trujillo, I., Barrio, E., Belaj, A., Barranco, D., & Rallo, L. (2011). Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Annals of Botany*, 108, 797–807. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr194>
- Duarte, F., Jones, N., & Fleskens, L. (2008). Traditional olive orchards on sloping land: Sustainability or abandonment? *Journal of Environmental Management*, 89, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.05.024>
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865),” pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>
- FAOSTAT. (2019). Food and agriculture organization of the United Nations. Accessed October 2021. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farràs, M., Almanza-Aguilera, E., Hernández, Á., Agustí, N., Julve, J., Fitó, M., & Castañer, O. (2020). Beneficial effects of olive oil and Mediterranean diet on cancer physio-

pathology and incidence. *Seminars in Cancer Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.011>

Fernandes, G. M. M. R. (2014). Caracterização morfológica e genética de cultivares de oliveiras centenárias e tradicionais para a obtenção de produtos diferenciados.

<https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11449>

Freitas, D. C. P. (2013). Caracterização fenólica de azeites virgens provenientes da cultivar galega vulgar e validação do método por HPLC

<https://repositorio.ipbeja.pt/handle/20.500.12207/713>

García-Vico, L., García-Rodríguez, R., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2017). Biochemical aspects of olive freezing-damage: Impact on the phenolic and volatile profiles of virgin olive oil. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 86, 240–246.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.052>

García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martín, A., Manéndez, J.A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2009) Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 416-429.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.06.021>

Gharby, S., Harhar, H., Jadouali, S. M., Hajib, A., Nounah, I., Farssi, M., & Taleb, A. A. (2018). Chemical profiles and Sensory analysis of four varieties of olive oil cultivated in Morocco. *Moroccan Journal of Chemistry* (6), 359-366. ISSN: 2351-

812X

- Grigoriadou, D., Androuraki, A., Psomiadou, E., & Tsimidou, M. Z. (2007). Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chemistry*, 105, 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.065>
- Gomes, S., Pinto, H. G., Lopes, P. M. (2012) Chapter 2: “Olive Tree Genetic Resources Characterization Through Molecular Markers”, *Mahmut Çaliskan “Genetic diversity in plants”*., 15-28, Intech. DOI:10.5772/32973
- Gurdeniz, G., Tokatli, F., & Ozen, B. (2007). Differentiation of mixtures of monovarietal olive oils by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1194–1202. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700087>
- Hassine, K.B., Taamalli A., Slama, M. B., Khouloud, T., Kiristakis, A., Benicasa, C., Perri, E., Malouche, D., Hammami, M., Bornaz, S., Kammoun N. G. (2015). Characterization and preference mapping of autochthonous and introduced olive oil cultivars in Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 112-121. DOI: 10.1002/ejlt.201400049
- International Olive Council, IOC (2017). The Portuguese Olive Sector. Accessed January 2021 <http://www.oliofficina.net/knowledge/economy/the-portuguese-olive-sector.html>
- International Olive Council, IOC (2020). Accessed January 2021 <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/06/IOC-Olive-Oil-Dashboard-June-2020.html#production-2>
- International Olive Council, IOC (2021). Accessed October 2021 <https://www.internationaloliveoil.org/888-international-course-for-panel-leaders-on-the-sensory-analysis-of-virgin-olive-oil/>
- Jiménez, B., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo, M. L., & Rivas, A. (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Research International*, 54, 1860–1867. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.016>

- Jimenez, B., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo, M. L., & Rivas, A. (2015). Effect of Agronomical Practices on the Nutritional Quality of Virgin Olive Oil at Different Ripening Stages. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 1491–1501. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2710-8>
- Jiménez Herrera, B., Rivas, A., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo Tovar, M. L., Úbeda Muñoz, M., Callejón, R. M., & Ortega Bernaldo De Quirós, E. (2012). Influencia del proceso de maduración del fruto en la calidad sensorial de aceites de oliva virgen de las variedades Picual, Hojiblanca y Picudo. *Grasas y Aceites*, 63(4): 403-410 <https://doi.org/10.3989/gya.058212>
- Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9, 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>
- Kalogeropoulos, N., & Tsimidou, M. (2014). Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 3, 387–413. <https://doi.org/10.3390/antiox3020387>
- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J.-F., Khadari, B., & Besnard, G. (2012). Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: Palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 87, 885–899. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00229.x>
- Lamas, S., Rodrigues, N., Fernandes, I. P., Barreiro, M. F., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2021). Fourier transform infrared spectroscopy-chemometric approach as a non-destructive olive cultivar tool for discriminating Portuguese monovarietal olive

- oils. *European Food Research and Technology*. 247, 2473-2484  
<https://doi.org/10.1007/s00217-021-03809-8>
- Lukić, M., Lukić, I., Krapac, M., Sladonja, B., & Piližota, V. (2013). Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chemistry*, 136, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.005>
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. (2014). How Agronomic Factors Affects Olive Oil Composition and Quality (pp. 119–141). In *Virgin Olive Oil: Production, Composition, Uses and Benefits for Man*. [S.l.]: Nova Science Publishers. p. 118-141. ISBN 9781631176623.
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). Physico-chemical characteristics of olive leaves and fruits and their relation with *Bactrocera oleae* (Rossi) cultivar oviposition preference. *Scientia Horticulturae*, 194, 208–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.017>
- Martínez, S. S., Gila D. M., Beyaz, A., Ortega, J. G., García, J. G. (2018). A computer vision approach based on endocarp features for the identification of olive cultivars. *Computers and electronics in agriculture*, 154, 341-346  
DOI:10.1016/j.compag.2018.09.017
- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31, 274–295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Neves, B., Pires, I. M., & Roxo, M. (2013). Culturas intensivas e superintensivas e a susceptibilidade à Desertificação: O caso do olival no Alentejo. IX Congresso da Geografia Portuguesa, Geografia: Espaço, Natureza, Sociedade e Ciência. 44-51. ISBN; 978-972-99436-6.

- Özdemir, İ. S., Dağ, Ç., Özinanç, G., Suçsoran, Ö., Ertaş, E., & Bekiroğlu, S. (2018). Quantification of sterols and fatty acids of extra virgin olive oils by FT-NIR spectroscopy and multivariate statistical analyses. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 91, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.045>
- Peres, A. M., Baptista, P., Malheiro, R., Dias, L. G., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 105, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.11.001>
- Pinheiro, P. B. M., & Esteves da Silva, J. C. G. (2005). Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L. *Analytica Chimica Acta*, 544, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.014>
- Planell, M. I. C., Torre, R. de la, & Fitó, M. (2014). Scientific evidence of the benefits of virgin olive oil for human health. *Medicina Balear*, 29, 39–46.
- Predieri, S., Medoro, C., Magli, M., Gatti, E., & Rotondi, A. (2013). Virgin olive oil sensory properties: Comparing trained panel evaluation and consumer preferences. *Food Research International*, 54, 2091–2094. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.014>
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034>
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., & Trujillo, I. (2018). Genotypic and phenotypic identification of olive cultivars from north-western Spain and characterization of their extra virgin olive oils in

- terms of fatty acid composition and minor compounds. *Scientia Horticulturae*, 232, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.015>
- Regulamento (CEE) N°2568/91 da Comissão de 11 de Julho (1991). *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* (L248, p.1-82)
- Regulamento Delegado (UE) N°1830/2015 da Comissão de 8 de Julho (2015). *Jornal Oficial da União Europeia* (L266/9, p.1-5)
- Regulamento de execução (UE) N°1348/2013 da Comissão de 16 de Dezembro (2013). *Jornal Oficial da União Europeia* (L338/31, p.1-37)
- Regulamento (UE) N°432/2012 da Comissão de 16 de Maio (2012). *Jornal Oficial da União Europeia* (L136/1, p.1-40)
- Rodrigues. (2018). Characterization of wild and centenarian olive trees for their valorization Accessed October 2021 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=180109>
- Rodrigues, N., Casal, S., Pinho, T., Peres, A. M., Bento, A., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2019). Ancient olive trees as a source of olive oils rich in phenolic compounds. *Food Chemistry*, 276, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.106>
- Rodrigues, N., Casal, S., Peres, A. M., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2020a). Seeking for sensory differentiated olive oils? The urge to preserve old autochthonous olive cultivars. *Food Research International*, 128, 108759, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108759>
- Rodrigues, N., Casal, S., Cruz, R., Peres, A. M., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2020b). GxE Effects on Tocopherol Composition of Oils from Very Old and Genetically Diverse Olive Trees. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 97, 497–507. <https://doi.org/10.1002/aocs.12339>

- Santos, J. M. (2018). Turismo de Natureza: Procura Turística e Imagem dos Espaços Naturais. Accessed September 2021  
<https://repositorio.ipv.pt/handle/10400.19/5245>
- Sebastiani, L., & Busconi, M. (2017). Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding. *Plant Cell Reports*, 36, 1345–1360. DOI: 10.1007/s00299-017-2145-9
- Tapp, H. S., Defernez, M., & Kemsley, E. K. (2003). FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis Can Distinguish the Geographic Origin of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6110– 6115.  
<https://doi.org/10.1021/jf030232s>
- Trujillo, I., Ojeda, M. A., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., & Diez, C. M. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10, 141–155. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0671-3>
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, 118, 139–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.030>
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2009). Environmental and seasonal influence on virgin olive (*Olea europaea* L.) oil volatiles in northern Italy. *Scientia Horticulturae*, 122, 385–392.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.021>
- UPOV-International Union for the Protection of New Varieties of Plants. (2011) Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability.

Available online: [https://www.upov.int/upov\\_collection/en/](https://www.upov.int/upov_collection/en/) (Accessed October 2021).

- Valand, R., Tanna, S., Lawson, G., & Bengtström, L. (2020). A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Additives & Contaminants*, 37, 19–38. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675909>
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Cultivar discrimination of Spanish olives by using direct FTIR data combined with linear discriminant analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1473–1479. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400425>
- Vitaglione, P., Savarese, M., Paduano, A., Scalfi, L., Fogliano, V., & Sacchi, R. (2015). Healthy Virgin Olive Oil: A Matter of Bitterness. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1808–1818. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.70868>