

Azeites Virgens: efeito da cultivar na composição química e estudo da adição de agentes para incremento de antioxidantes quando sujeitos a aquecimento em micro-ondas

Bárbara Martins

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

Orientado por

Prof. Doutor José Alberto Pereira

Prof. Doutor Paulo Henrique Março

**Bragança
2015**

Aos meus pais, irmão e aqueles amigos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e conquistas que me foi concedida até aqui, e por nunca me deixar esquecer de que a fé é o combustível que move a vida.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Brasil) e ao Instituto Politécnico de Bragança pela oportunidade e assistência dada do início ao fim.

Aos meus orientadores e Professores Doutores José Alberto Pereira e Paulo Henrique Março por terem aceitado a orientação deste trabalho, pelos conselhos, apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Susana Casal, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por toda a ajuda nas determinações laboratoriais.

Aos meus colegas de laboratório, Doutor Ricardo Malheiro e Engenheiro Nuno Rodrigues, pela paciência, apoio e por todo o conhecimento repassado. Sem dúvidas os dias nos laboratórios não seriam os mesmos sem vocês.

A minha família UTFPR, em especial a minha amiga Franciely Oliveira, por terem a paciência quando eu não tive, por me fornecerem o riso quando me faltava, por me dizerem as palavras certas nas horas certas. A minha buddy Natalia Sofia por todo carinho, apoio e amizade, sem dúvidas Portugal não seria o mesmo sem você!

A minha amiga Camila Bissaro, que foi a minha família dentro e fora do laboratório. Obrigada por toda a ajuda com a parte experimental, a paciência e o suporte nos momentos em que necessitei.

Aos meus amigos, em especial minhas amigas Emanuella Marques e Sara Castro, que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos. Obrigada pela amizade, companheirismo e conselhos dados ao longo desta caminhada.

Ao meu irmão e minha família que me apoiou e incentivou durante toda a trajetória até chegar aqui.

Por fim, àqueles que são a minha fonte de inspiração e apoio incondicional, meus pais, dedico cada linha escrita neste trabalho. Todo o esforço que vocês fizeram para eu realizar este e tantos outros sonhos, foram a minha base para jamais desistir diante as dificuldades que me foram imposta. “Aprenda como se você fosse viver para sempre, viva como se fosse morrer amanhã” (Mahatma Ghandi).

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE QUADROS	xix
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. INFLUÊNCIA DA CULTIVAR DA OLIVEIRA NA COMPOSIÇÃO DO AZEITE.....	9
2.1.1. Composição em ácidos gordos.....	9
2.1.2. Composição em tocoferóis e tocotrienóis	11
2.1.3. Composição em esteróis.....	12
2.1.4. Composição em pigmentos	13
2.1.5. Composição em compostos fenólicos	13
2.2. EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS AO AZEITE	15
2.2.1. Extratos de plantas ricos em antioxidantes	15
2.2.2. Adição de especiarias e aromatizantes.....	16
2.2.3. Extratos de algas ricos em antioxidantes	16
2.3. EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. CARATERIZAÇÃO DE AZEITES ELEMENTARES.....	23
3.2. EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS EM AZEITE VIRGEM COM E SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i>	24
3.3. PARÂMETROS DE QUALIDADE	26
3.3.1. Acidez	26

3.3.2.	Índice de Peróxido	26
3.3.3.	Espectrofotometria no Ultravioleta	27
3.3.4.	Análise sensorial	28
3.4.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	28
3.4.1.	Composição em ácidos gordos.....	28
3.4.2.	Composição em tocoferóis e tocotrienóis	29
3.4.3.	Composição em esteróis.....	30
3.4.4.	Composição em pigmentos	31
3.5.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
3.5.1.	Teor em fenóis totais.....	32
3.5.2.	Estabilidade oxidativa	32
3.5.3.	Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH [*])	33
3.5.4.	Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS ⁺⁺)	33
3.6.	COLORIMETRIA.....	34
3.7.	ANÁLISE DE DADOS.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES ELEMENTARES	39
4.1.1.	Parâmetros de qualidade	39
4.1.1.1.	<i>Acidez.....</i>	<i>39</i>
4.1.1.2.	<i>Índice de Peróxido.....</i>	<i>40</i>
4.1.1.3.	<i>Espectrofotometria no Ultravioleta.....</i>	<i>41</i>
4.1.1.4.	<i>Análise sensorial.....</i>	<i>41</i>
4.1.2.	Composição química.....	44
4.1.2.1.	<i>Composição em ácidos gordos.....</i>	<i>44</i>
4.1.2.2.	<i>Composição em tocoferóis e tocotrienóis.....</i>	<i>47</i>
4.1.2.3.	<i>Composição em esteróis</i>	<i>48</i>
4.1.3.	Atividade antioxidante	52

4.1.3.1.	<i>Teor em fenóis totais.....</i>	52
4.1.3.2.	<i>Estabilidade oxidativa</i>	54
4.1.3.3.	<i>Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH[•]) ..</i>	55
4.1.3.4.	<i>Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS^{•+})..</i>	56
4.1.4.	Colorimetria	57
4.2.	EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS EM AZEITE VIRGEM COM E SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i>	60
4.2.1.	Parâmetros de qualidade	60
4.2.2.	Composição química.....	64
4.2.2.1.	<i>Composição em ácidos gordos.....</i>	64
4.2.2.2.	<i>Composição em tocoferóis e tocotrienóis.....</i>	67
4.2.2.3.	<i>Composição em pigmentos</i>	69
4.2.3.	Atividade antioxidante	70
4.2.4.	Colorimetria	71
5.	CONCLUSÕES	75
6.	BIBLIOGRAFIA.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principais ácidos gordos presentes no azeite	9
Figura 2. Estrutura química dos tocoferóis.....	11
Figura 3. Estrutura química do β -sitosterol.	12
Figura 4. Fatores que exercem influência sobre a planta e conseqüentemente sobre a composição química dos seus produtos, adaptado de Malheiro et al. (2015).	14
Figura 5. Comparação entre o perfil fenólico na azeitona e no azeite virgem correspondente. Gómez-Rico et al. (2008).....	15
Figura 6. Perfil Sensorial dos azeites da cv. Arbequina (ARB) (a) e dos azeites elementares das restantes cultivares (ARBS: cv. Arbosana; ARR: cv. Arroniz; COB: cv. Cobrançosa; COR: cv. Cornicabra; FRAN: cv. Frantoio; HOJ: cv. Hojiblanca; MANZ: cv. Manzanilla; PCL: cv. Picual; PCD: cv. Picudo; RED: cv. Redondilla; ROY: cv. Royuela; ZOR: cv. Zorzal ITA) (b).....	43
Figura 7. Valores médios de Esteróis Total com desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os azeites elementares das restantes cultivares (b) expressos em mg/kg.....	49
Figura 8. Valores médios de Eritrodiol + Uvaol com desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os azeites elementares das restantes cultivares (b) em percentagem.....	52
Figura 9. Valores médios de fenóis totais com desvio padrão dos azeites da cv. Arbequina (a) e dos azeites elementares das restantes cultivares (b).....	53
Figura 10. Valores médios de estabilidade oxidativa (horas) e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).....	54
Figura 11. Valores médios da atividade sequestradora do radical DPPH do azeite e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).....	56
Figura 12. Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS do azeite e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).....	57
Figura 13. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas, com relação aos parâmetros de qualidade.....	62
Figura 14. a) Loadings de PC 1 e b) Loadings de PC 2, relacionados com as diferentes variáveis avaliadas.....	64

Figura 15. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas, com relação aos ácidos gordos.....	66
Figura 16. a) Loadings de PC1 e b) Loadings de PC5, relacionados com as diferentes variáveis avaliadas.....	66
Figura 17. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas quanto ao teor de diferentes tocoferóis.....	68
Figura 18. a) Loadings de PC1 e b) Loadings de PC5, relacionados com as variáveis (1) α -Tocoferol, (2) β -Tocoferol e (3) γ -Tocoferol.....	69
Figura 19. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de estabilidade oxidativa (horas) (a), atividade sequestrante do radical livre DPPH (percentagem de inibição) (b) e atividade sequestrante do radical livre ABTS (percentagem de inibição) (c) para os azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeito a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) adição de extrato de alga.....	71
Figura 20. Diferença de cor dos azeites submetidos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) adição de extrato de alga.....	72
Figura 21. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas quanto a parâmetros de cor.....	73
Figura 22. a) Loading de PC2 e b) Loadings de PC3, relacionados com as variáveis de CIELAB L^* (1), a^* (2), b^* (3), HUNTER L (4), a (5), b (6) e YI (7).....	73

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição em ácidos gordos de diferentes cultivares espanholas.	10
Quadro 2. Concentração média de polifenóis e tocoferóis encontrado em cultivares de azeites virgens	12
Quadro 3. Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez total (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O2/kg); K232; K270 e ΔK] dos azeites elementares (média e desvio padrão).	39
Quadro 4. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites da cv. Arbequina (média \pm desvio padrão).	45
Quadro 5. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites elementares de diferentes cultivares (média \pm desvio padrão expressos em percentagem).	46
Quadro 6. Valores médios de tocoferóis e vitamina E total (mg/kg) dos azeites elementares (média \pm desvio padrão).	48
Quadro 7. Valores médios e desvio padrão dos Esteróis Totais para os azeites elementares em percentagem.....	50
Quadro 8. Valores médios de colorimetria (L^* , a^* , b^* , L , a e b) e de índice de amarelecimento (YI) dos azeites elementares (média e desvio padrão).....	59
Quadro 9. Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez total (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O2/kg); K_{232} ; K_{270} e ΔK] dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5).....	61
Quadro 10. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) (média e desvio padrão em percentagens).	64
Quadro 11. Valores médios de tocoferóis e vitamina E total (mg/kg) dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com(T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) (média e desvio padrão).....	67
Quadro 12. Valores médios da determinação de pigmentos nos azeites sujeitos a aquecimento com(T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) expressos em mg/kg.	69
Quadro 13. Valores médios de colorimetria (L^* , a^* , b^* , L , a e b) e respetivos desvio padrão.	71

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

O azeite é o óleo vegetal mais apreciado pelos consumidores, devido às suas características organolépticas e composição química que lhe conferem propriedades únicas. Quer as características sensoriais quer as químicas estão muito dependentes da cultivar de oliveira. Por sua vez, na cozinha moderna, cada vez mais os azeites estão sujeitos a processos térmicos que influem nas suas propriedades, tendo os antioxidantes um papel importante na prevenção dessa ação. Assim, o presente trabalho teve por objetivo o estudo de diferentes azeites elementares ao nível da sua qualidade, composição química e atividade antioxidante e o estudo do efeito da adição de extratos de alga *Scenedesmus almeriensis* na composição quando o azeite é sujeito a aquecimento.

A caracterização dos azeites elementares mostrou que o fator cultivar é determinante para na composição. Para os parâmetros de qualidade, os azeites elementares apresentaram valores dentro dos limites estabelecidos para a classificação de azeite virgem extra. Os azeites obtidos eram diferentes em termos de composição química, características sensoriais e atividade antioxidante. A cv. Manzanilla apresentou o maior conteúdo em ácido oleico (83,43%). Em relação as frações dos ácidos gordos PUFA/SFA, as cvs. Arbonosa, Cobrançosa, Cornicabra e Manzanilla apresentaram valores ligeiramente abaixo do limite recomendado.

No que respeita à adição de extrato de alga, observou-se um efeito protetor quando o azeite foi submetido a aquecimento. O azeite aquecido sem adição de alga apresentou valores de índice de peróxido superiores, enquanto que o azeite aquecido com adição de alga, devido ao teor em pigmentos, valores superiores de coeficientes de extinção K_{232} e K_{270} . A análise da composição química mostrou que os ácidos gordos e os tocoferóis não foram afetados pela adição de extrato de alga. A adição de extrato de alga ao azeite teve um efeito positivo na atividade antioxidante apresentando-se esses azeites mais estáveis. A colorimetria mostrou que os azeites com extratos de alga apresentavam coloração mais laranja o que estará relacionado com o teor superior em pigmentos. Os resultados obtidos permitem afirmar que a adição de extrato de alga não alterou significativamente os parâmetros de qualidade do azeite, podendo favorecer um aumento da sua resistência quando exposta ao aquecimento.

Palavras-chave: Azeites elementares, caracterização, antioxidantes, extrato de alga, *Scenedesmus almeriensis*, aquecimento, estabilidade oxidativa.

ABSTRACT

Olive oil is the vegetable oil most appreciated by the consumer due to its organoleptic characteristics and chemical composition that confer unique properties. Whether the sensory and chemical characteristics are highly dependent on olive cultivar. In turn, in modern kitchen, is increasing the use of vegetable oils under thermal process, which influence their properties, having antioxidants an important role in preventing this action. The present study aimed to the study of different varietal oils in terms of their quality, chemical composition and antioxidant activity and the effect of adding algae extracts from *Scenedesmus almeriensis* in the composition when the oil is subjected to heating.

The characterization of the varietal olive oils showed that the cultivar factor is crucial to the composition. For quality parameters, the varietal olive oils showed values within the legal limits established for extra virgin olive oil classification. The oils obtained were different in terms of their chemical composition, sensory characteristics and antioxidant activity. The cv. Manzanilla had the highest content of oleic acid (83.43%). For the PUFA/SFA fraction of fatty acids, cvs. Arbonosa, Cobrançosa, Cornicabra and Manzanilla had values slightly below the recommended range.

Regarding the addition of algae extract, we observed a protective effect when the oil was subjected to heating. The heated oil without the addition of algae showed greater peroxide index values, while the heated oil with the addition of algae, due to the pigments content, reported higher values for K_{232} and K_{270} extinction coefficients. The chemical composition analysis showed that the fatty acids and tocopherols were not affected by the addition of algae extract. Addition of olive oil algae extract had a positive effect on antioxidant activity presenting these oils higher stability. The colorimetry showed that the oils with algae extracts had more orange color which is related to higher pigment content. The results allow us to state that the addition of algae extract did not significantly alter the oil quality parameters that could favor an increase in their resistance when exposed to heat.

Keywords: varietal oils, characterization, antioxidants, algae extract, *Scenedesmus almeriensis*, heating, oxidative stability.

1. INTRODUÇÃO

O azeite virgem é o óleo obtido a partir do fruto da oliveira (*Olea europea* L.) unicamente por processos mecânicos ou físicos sob condições, nomeadamente térmicas, que não o alterem e que não tenha sofrido qualquer tratamento além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração (COI, 2015). Este possui uma composição química equilibrada que lhe confere qualidade e alto valor nutricional. Devido aos muitos benefícios para a saúde e às características organolépticas que advêm da sua composição, o azeite é na atualidade um óleo de elevado valor comercial e por isso sujeito a adulterações que podem alterar tanto a sua genuinidade como tipicidade.

De acordo com o Regulamento Europeu 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, e respetivas alterações, o azeite pode ser comercializado nos países membros de acordo com a classificação comercial:

Azeite virgem extra – azeite virgem com gosto e sabor perfeitamente irrepreensível cuja acidez livre, expressa em ácido oleico, não seja superior a 0,8%, e que cumpra os restantes parâmetros do regulamento europeu para a categoria.

Azeite virgem – azeite com gosto e sabor irrepreensível, e cuja acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2%, e que cumpra os restantes parâmetros do regulamento europeu para a categoria.

Azeite – azeite constituído por uma mistura de azeite refinado com azeite virgem, com exclusão do lampante, cuja acidez livre expressa em ácido oleico, não seja superior a 1,5% e que cumpra os restantes parâmetros do regulamento europeu para a categoria.

O azeite virgem que não cumpre os parâmetros para ser incluído nas categorias de azeite virgem extra e azeite virgem é denominado azeite lampante.

O Regulamento Europeu 2568/91 e respetivas alterações, ainda referem que apenas podem ser destinados ao consumo final azeite virgem extra, o azeite virgem e o azeite. O azeite virgem lampante só pode ser utilizado para fins comestíveis depois de refinado, e o azeite refinado só pode ser usado para a obtenção de tipo comercial azeite.

A composição química do azeite é dividida em duas frações, maioritária e minoritária (Firestone, 2005). A fração maioritária, que compõe a maior parte (98-99%) do azeite, é constituída essencialmente por triglicérides e em menor amplitude por ésteres de glicerina com ácidos gordos e ácidos gordos livres. Os ácidos gordos predominantes podem ser classificados em saturados, monoinsaturados ou

poliinsaturados, de acordo com a sua estrutura, ligações simples, ligações duplas e uma dupla ou três ligações duplas, respectivamente. Contudo, o ácido gordo predominante no azeite é o ácido oleico (55-83%), que é monoinsaturado. A fração minoritária é composta por diferentes componentes de onde se destacam os compostos fenólicos, os tocoferóis e os carotenoides. Embora sendo uma fração menor (1-2%), apresenta grande importância do ponto de vista biológico e nutricional do azeite, nas características organolépticas e, ainda, na sua resistência à oxidação (Gunstone, 2011; Gutiérrez e Carretero, 2009).

O Conselho Oleícola Internacional (COI, 2015) estabelece limites sobre a composição de ácidos gordos para cada categoria de azeite. Os principais ácidos gordos que compõem a fração maioritária são o ácido oleico, ocupa entre 55-83% do total, ácido palmítico entre 7,5-20%, ácido linoleico entre 2,5-21%, ácido esteárico com 0,5-5%, ácido palmitoleico 0,3-3,5% e ácido linolénico $\leq 1,0\%$. A fração minoritária é representada por cerca de 230 componentes que ocupam em torno de 2% da composição do azeite. Esteróis ocupam em média 0,16% do peso total, polifenóis 0,03%, terpenos 0,5% e tocoferóis 0,02%.

Há diversos fatores que influem ao nível da qualidade e composição do azeite, como sejam as condições climáticas e as características do solo onde as plantas são cultivadas, as práticas de cultivo, a cultivar, o ataque de pragas, doenças, o estado de maturação da azeitona, a colheita, o processo de extração do azeite e condições de conservação antes, durante e depois do processamento (Gutiérrez e Carretero, 2009).

A cultivar de oliveira é um dos aspetos que mais influi na composição química do azeite. De uma maneira geral, diferentes cultivares de oliveira têm diferentes quantidades de óleo, que apresentam composição química distinta, o que influi tanto na qualidade do produto como na sua estabilidade. Além da cultivar, alguns fatores como sejam a de irrigação (Patumi *et al.*, 2002), o estado de maturação do fruto (Kalua *et al.*, 2005) e a origem geográfica de produção (Vinha *et al.*, 2005) devem ser levados em consideração, pois afetam direta ou indiretamente a quantidade da fração minoritária presente no azeite, alterando os compostos aromáticos, a estabilidade oxidativa e conseqüentemente o tempo de vida do produto.

Por outro lado, nos últimos anos tem aumentado a utilização por parte dos consumidores de métodos rápidos de processamento, como sejam a utilização de micro-ondas na culinária, o que influi tanto na qualidade como na composição do azeite

utilizado. Alguns autores sugerem que a adição de extratos ricos em antioxidantes, para além de aumentarem o valor biológico intrínseco do produto, pode minimizar os efeitos nefastos do aquecimento em micro-ondas (Farag *et al.*, 2003; Malheiro *et al.*, 2013a; Rodrigues *et al.*, 2012).

Neste sentido, os objetivos do presente trabalho são por um lado proceder à caracterização química e atividade antioxidante de azeites de diferentes cultivares de oliveira, e por outro, estudar o efeito protetor da adição de extrato da alga *Scenedesmus almeriensis* ao azeite quando aquecido em micro-ondas. Assim, na parte introdutória far-se-á uma breve descrição sobre o efeito da cultivar de oliveira na composição do azeite; e considerando a preocupação crescente com a riqueza em antioxidantes das matrizes vegetais e a sua preservação no processo culinário, faz-se uma breve abordagem à utilização de microalgas como matéria para a preparação de extratos ricos em antioxidantes naturais com efeito protetor do processo oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INFLUÊNCIA DA CULTIVAR DA OLIVEIRA NA COMPOSIÇÃO DO AZEITE

Existe uma vasta gama de cultivares de oliveira conhecidas e produzidas comercialmente. Muitos países da Europa, do Oriente Médio e África do Norte utilizam o recurso de cultivares de oliveira distintas, apresentando características morfológicas distintas e, conseqüentemente, produzindo azeites distintos entre si.

Vários trabalhos têm demonstrado que a cultivar exerce um fator determinante na composição e características dos azeites (Aranda *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2010; Criado *et al.*, 2007; Gómez-Rico *et al.*, 2008; Kalua *et al.*, 2005; Tura *et al.*, 2007), os quais relatam em suas pesquisas alguns dos parâmetros que normalmente são afetados pela cultivar. A seguir, se descreve brevemente sobre os principais parâmetros.

2.1.1. Composição em ácidos gordos

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, podendo conter apenas ligações simples (neste caso são denominados de ácidos gordos saturados), ou conterem uma ou mais ligação dupla, sendo denominados de ácidos gordos monoinsaturados e poliinsaturados, respetivamente (Figura 1). O ácido gordo predominante no azeite é o ácido oleico, um monoinsaturado (Gutiérrez e Carretero, 2009).

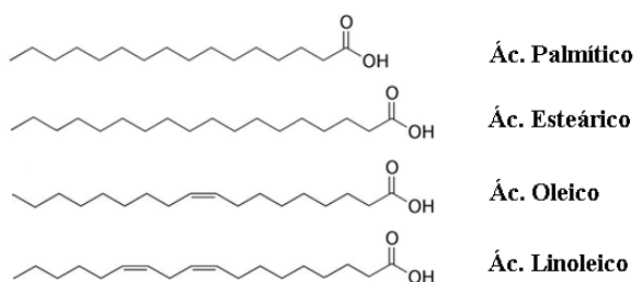


Figura 1. Principais ácidos gordos presentes no azeite

Segundo Matthäus e Özcan (2011), a composição de ácidos gordos do azeite oscila amplamente entre as diferentes cultivares. Além disso, os ácidos gordos saturados, como os ácidos palmítico e estearico, e ácidos gordos insaturados, como ácidos oleico, linoleico e linolénico, sucedem em diferentes proporções.

O elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados faz com que o azeite seja diferente de todos os outros óleos vegetais. A quantidade de ácidos gordos livres presente no azeite depende da zona de produção, latitude, clima, cultivar da azeitona e o seu estado de maturação. Essas diferenças de composição de ácidos gordos provavelmente refletem o comportamento metabólico específico de cada cultivar, que é controlado por determinantes genéticos (Aparicio e Luna, 2002).

Reboredo-Rodríguez *et al.* (2015), relataram diferentes valores para a acidez livre, em % de ácido oleico, de 0,08 e $0,13 \pm 0,01$ para azeites das cvs. Arbequina e Picual, respetivamente, apresentando essas cultivares composição acídica diferente. O ácido oleico, ácido gordo principal, apresentou variação em sua constituição para cada cultivar, sendo de 76,09% (em Arbequina) e 82,61% (em Picual), enquanto que o ácido linoleico, o ácido gordo essencial principal, foi de 7,30% (em Arbequina) para 2,85% (em Picual).

Aranda *et al.* (2004), compararam azeites virgens da cv. Cornicabra com outras cultivares espanholas em relação a composição de ácidos gordos, apresentadas na Quadro 1, e constatou que, as cvs. Cornicabra e Picual apresentaram as maiores concentrações de ácido oleico e menores para ácido linoleico e linolénico. A cv. Hojiblanca apresentou as menores concentrações para ácido palmítico, palmitoleico e em ácidos gordos saturados (SFA), enquanto que a cv. Arbequina apresentou as maiores concentrações de ácido palmítico, palmitoleico e linoleico, SFA e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) entre as cultivares analisadas.

Quadro 1. Composição em ácidos gordos de diferentes cultivares espanholas.

Ácido gordo	Cultivar			
	Cornicabra	Picual	Hojiblanca	Arbequina
C _{16:0}	9,22 ± 0,17	10,6 ± 0,78	9,68 ± 1,00	13,7 ± 0,99
C _{16:1}	0,77 ± 0,11	0,91 ± 0,13	0,73 ± 0,15	1,42 ± 0,24
C _{17:1}	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,26 ± 0,02
C _{18:0}	3,36 ± 0,29	3,49 ± 0,47	3,48 ± 0,21	2,03 ± 0,19
C _{18:1}	80,4 ± 0,96	78,9 ± 1,62	76,6 ± 1,54	70,6 ± 1,70
C _{18:2}	4,46 ± 0,57	4,53 ± 1,14	7,51 ± 1,13	10,3 ± 0,87
C _{18:3}	0,62 ± 0,08	0,67 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,61 ± 0,05
SFA	13,3 ± 0,67	14,6 ± 0,70	13,9 ± 0,92	16,4 ± 0,97

Fonte: adaptada de Aranda *et al.*, (2004).

Por outro lado, os estudos de Salvador *et al* (2001), Baccouri *et al* (2008) e Mendonza *et al* (2013), mostraram que as relações encontradas para os principais ácidos gordos presentes no azeite apresenta uma variação entre cultivares, e até mesmo, entre colheitas de safras diferentes de uma mesma cultivar, mas não ultrapassam o limite permitido, sendo assim um fator diferencial e não prejudicial a qualidade do azeite.

2.1.2. Composição em tocoferóis e tocotrienóis

São componentes muito importantes no azeite por apresentarem capacidades antioxidante e vitamínica, que juntamente com outros compostos auxiliam na estabilidade dos azeites. Os tocoferóis, juntamente com os tocotrienóis, constituem um grupo de substâncias que formam a vitamina E. Na natureza existem quatro tocoferóis, designados por alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) (Figura 2). O α -tocoferol representa aproximadamente 90-95% do teor de tocoferóis totais no azeite. Em consequência, muitas referências têm abordado estes compostos correlacionados a estabilidade oxidativa (Tura *et al.*, 2007).

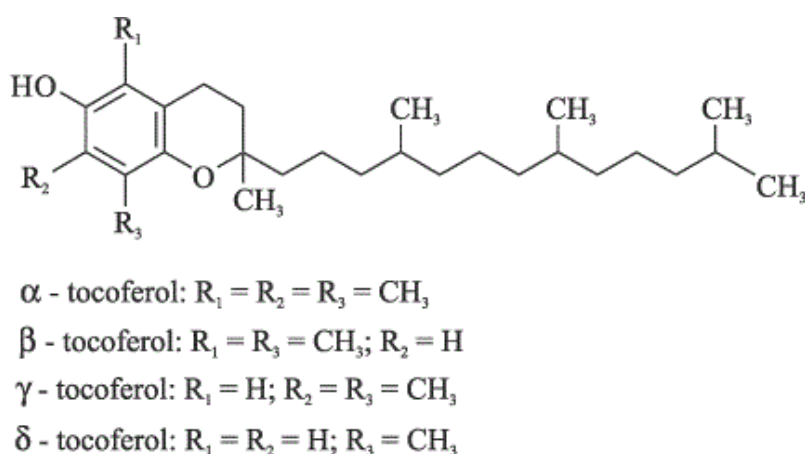


Figura 2. Estrutura química dos tocoferóis.

Estudos sobre a influência da cultivar na composição minoritária de azeites virgens apontam que o teor em tocoferóis, nomeadamente α -tocoferol, sofre uma variação assinalável. Esta variação é justificada pela maturação do fruto, pelo fator cultivar e pela geografia, tendo sido registadas, por exemplo, uma maior quantidade de tocoferol proveniente de cultivares colhidas em baixas altitudes do que daquelas provindas de regiões de maiores altitudes (Aparicio e Luna, 2002; Cayuela *et al.*, 2006;

Gimeno *et al.*, 2002; Gómez Rico *et al.*, 2009; Matos *et al.* 2007; Matthäus e Özcan, 2011; Tura *et al.*, 2007). Aparicio e Luna (2002), durante a caracterização de azeites virgens monovarietais, observaram variação entre os teores de tocoferol presente nas cvs. Hojiblanca, Picual, Picudo e Redondilla, variando entre 287 e 331mg/kg (Quadro 2).

Quadro 2. Concentração média de polifenóis e tocoferóis encontrado em cultivares de azeites virgens

Cultivar	Polifenóis total [mg/kg de ácido cafeico]	Tocoferóis total [mg/kg]
Hojiblanca	247	323
Picual	483	331
Picudo	243	287
Redondilla	247	296

Fonte: Aparicio & Luna (2002).

2.1.3. Composição em esteróis

Os compostos esterólicos são álcoois tetracíclicos biossintetizados a partir do esqualeno e é de alta importância a sua presença em azeites, uma vez que está relacionada à qualidade e autenticidade (Guiné, 2014). O teor de esteróis no azeite refinado é consideravelmente reduzido devido às perdas significativas destes na etapa de branqueamento do processo de refino (García-González *et al.*, 2008).

O principal esterol presente no azeite é o β -sitosterol (Figura 3), e em menores quantidades o colesterol, brassicasterol, estigmasterol, campesterol, Δ -7-estigmasterol e β -sitosterol aparente. Alguns fatores como a cultivar, o grau de maturação e as condições em que o fruto é submetido antes da extração, influenciam no conteúdo de esteróis (Ghanbari *et al.*, 2012; Sena-Moreno *et al.*, 2015; Casas *et al.*, 2004).

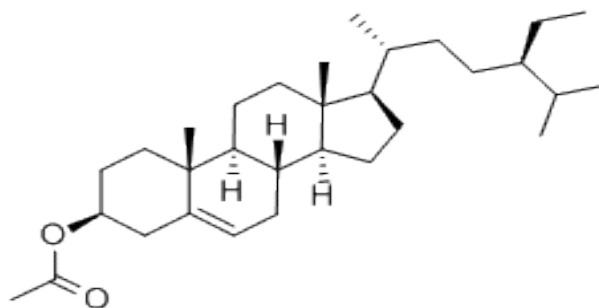


Figura 3. Estrutura química do β -sitosterol.

2.1.4. Composição em pigmentos

As clorofilas e os carotenoides são os pigmentos responsáveis pela cor dos azeites. As clorofilas a e b e os seus produtos de oxidação, feofitinas a e b, são responsáveis pela cor esverdeada. Já os carotenoides (luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina) são os responsáveis pela cor amarelada dos azeites (Kiritsakis *et al.*, 2001). Os pigmentos têm ainda um papel importante na atividade oxidativa dos azeites, uma vez que atuam como antioxidante ao abrigo da luz e pró-oxidante quando expostos à luz (Giuffrida *et al.*, 2007).

Os carotenoides, juntamente com os polifenóis e tocoferóis, fornecem uma estabilidade oxidativa ao azeite e têm um efeito sinérgico de antioxidantes e anti carcinogénicos. A quantidade destes compostos é influenciada pela cultivar, índice de maturação, zona de produção, sistema de extração, e condições de armazenamento (Boskou *et al.*, 2006; Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2001).

2.1.5. Composição em compostos fenólicos

As azeitonas possuem, na sua maioria, compostos fenólicos hidrossolúveis presentes na polpa, que passam numa pequena quantidade para o azeite. Os compostos fenólicos incluem uma série de substâncias diferentes, tais como o ácido vanílico, ácido gálico, ácido cumárico, ácido cafeico, tirosol e hidroxitirosol, sendo a sua presença no azeite relacionada diretamente com a cultivar, grau de maturação da matéria-prima, as condições de armazenamento, condições climáticas e do tipo de tecnologia utilizada na sua produção, sendo os principais responsáveis pela maior parte das propriedades antioxidantes dos azeites virgens proporcionando características únicas de sabor rico e complexo (Boskou, 2008; Visioli *et al.*, 2006). Essa relação está ilustrada na Figura 4.

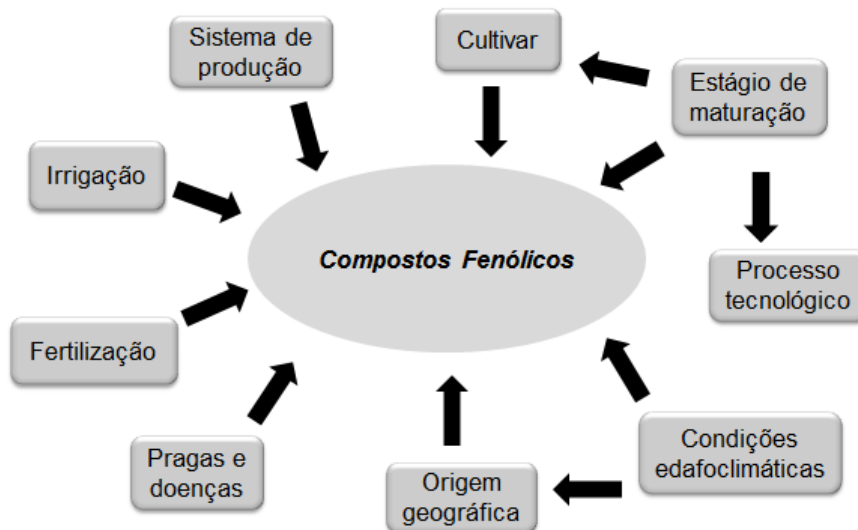


Figura 4. Fatores que exercem influência sobre a planta e conseqüentemente sobre a composição química dos seus produtos, adaptado de Malheiro *et al.* (2015).

Segundo Gómez-Rico *et al.* (2008), os estudos realizados sobre a fração minoritária em azeitonas espanholas e seus correspondentes azeites virgens, em função dos efeitos das diferentes cultivares e estado de maturação, relataram que os secoiridoides, derivados de hidroxitirosol e tirosol, foram os de maior teor fenólico dentre as cultivares analisadas. Entretanto, a sua distribuição teve variação nas diferentes cultivares. Para as cvs. Arbequina, Cornicabra e Picual, os complexos de fenóis mais importantes foram os secoiridoides derivados do hidroxitirosol, enquanto na cv. Picudo foram os secoiridoides derivados do tirosol, como demonstrado na Figura 5.

Por sua vez, Malheiro *et al.* (2014) demonstraram, recorrendo a técnicas de quimiometria, que o perfil fenólico dos frutos no momento de colheita permite discriminar a cultivar de oliveira quanto a sua origem, e constatou ainda que a maturação influi de diferentes formas de acordo com a cultivar, o que originará conseqüentemente produtos diferentes de acordo com a cultivar e índice de maturação das azeitonas.

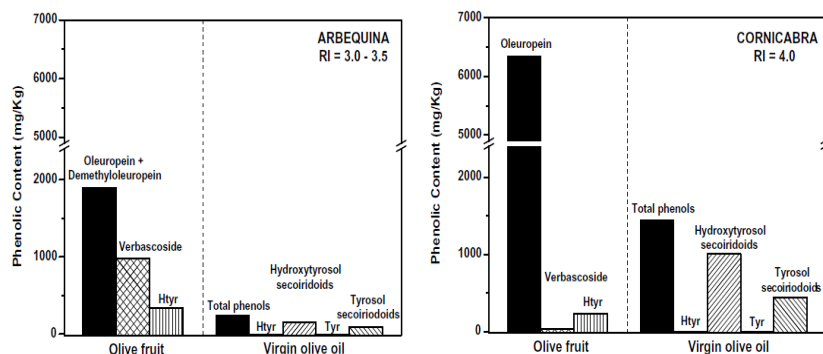


Figura 5. Comparação entre o perfil fenólico na azeitona e no azeite virgem correspondente. Gómez-Rico et al. (2008).

2.2. EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS AO AZEITE

2.2.1. Extratos de plantas ricos em antioxidantes

Os antioxidantes vêm sendo tema de muitos estudos nos últimos tempos devido a sua ação preventiva com respeito às reações oxidativas, aumentando, por consequência, a estabilidade dos óleos e gorduras (Baiano *et al.*, 2010). A oxidação lipídica é um dos fatores principais que leva a perda da qualidade dos alimentos, podendo ser feita a sua prevenção ou retardamento por meio de adição de antioxidantes (Rodrigues *et al.*, 2012). Os ácidos gordos insaturados são os principais substratos alvos de oxidação, os quais podem formar compostos tóxicos e perigosos para a saúde humana (Laguerre *et al.*, 2007), sendo, desta maneira, necessário encontrar métodos para aumentar a estabilidade e qualidade nos óleos vegetais. Estudos realizados nos últimos anos apresentam resultados importantes com a adição de antioxidantes em azeites e outros óleos vegetais, como a adição de folhas de oliveira (Farag *et al.*, 2003; Malheiro, *et al.*, 2013a; Mohammadi *et al.*, 2015), extratos de lavanda (Rodrigues *et al.*, 2012), extratos de chá verde (Malheiro *et al.*, 2012), extratos de semente e casca de uvas tintas (Shaker, 2006) e extratos de folhas de vegetais (Shyamala *et al.*, 2005).

A inclusão de matrizes ricas em compostos antioxidantes como, por exemplo, a folha da oliveira ou citrinos, durante o processo de extração, contribuem para um aumento considerável da estabilidade oxidativa e qualidade nutricional. Durante o processo de extração uma fração significativa dos compostos fenólicos fica retida no azeite e a outra é eliminada nas águas de vegetação. Malheiro *et al.* (2013a), ao estudarem o efeito da adição de folhas de oliveira durante o processo de extração do azeite, observaram que este óleo foi enriquecido por vários compostos que melhoraram

sua aparência, resistência à oxidação e composição. Contudo, o aumento do teor de PUFA e feofitina em quando foram adicionadas folhas em algumas concentrações pode implicar perda da estabilidade oxidativa. Os autores relatam também que este método tem maior aplicabilidade em azeitonas sobrematuradas, como uma forma de melhorar a qualidade do óleo a ser extraído, mas também pode ser aplicado em outros azeites, de forma a aumentar o tempo de vida, a estabilidade oxidativa e qualidade nutricional.

2.2.2. Adição de especiarias e aromatizantes

A adição de diferentes aromas e especiarias no azeite afeta cada um de maneira distinta na composição e conseqüentemente na qualidade. Sousa *et al.* (2015), observaram a influência de diferentes aromas comumente usados na cozinha mediterrânea e que foram usados como aromatizantes em azeites no que respeita aos parâmetros de qualidade, composição em ácidos gordos, tocoferóis, tocotrienóis, atividade antioxidante, teor em fenóis totais e estabilidade oxidativa. Concluíram que o alho induziu um aumento nos valores de acidez livre, mas manteve os parâmetros de qualidade dentro dos admissíveis para a categoria. Os azeites sofreram um enriquecimento nutricional devido ao aumento do teor de vitamina E, principalmente em azeites aromatizados com malagueta. As propriedades antioxidantes foram influenciadas de forma positiva ao considerar-se que, apesar do teor em fenóis totais diminuir, a capacidade de neutralizar a oxidação aumentou.

2.2.3. Extratos de algas ricos em antioxidantes

As algas apresentam na sua constituição uma série de compostos bioativos de alto potencial benéfico para a saúde, tornando-se uma alternativa como ingrediente funcional para a indústria e processamento alimentar. As algas comestíveis contêm níveis aceitáveis de proteína, com uma composição de grande valor nutricional. O seu teor lipídico mostra uma proporção elevada em ácidos gordos essenciais e poliinsaturados, sendo também uma fonte de minerais e fibra alimentar (López-López *et al.*, 2009). A atividade antioxidante das algas é relacionada ao seu teor de carotenoides, compostos fenólicos, α -tocoferol, flavanoides entre outros. Nesse sentido, nos últimos tempos passaram a considerá-las não só como um aditivo alimentar, com aplicações

como gelificantes e espessantes, mas também como antioxidante natural, atuando na prevenção da oxidação dos alimentos (Plaza *et al.*, 2008).

Os compostos antioxidantes das algas atuam contra uma série de doenças, apresentando potencial anti-inflamatório, antibacteriano e até antifúngico (Baghel *et al.*, 2014; Cornish e Garbary, 2010; Krinsky e Johnson, 2005). A luteína é um dos carotenoides com atividade antioxidante mais importante, podendo ser encontrado em alguns vegetais tais como couves, espinafres, e brócolos, e também na flor de calêndula (Krinsky e Johnson, 2005; Ozawa *et al.*, 2012). Dwyer *et al.* (2001), Nishino *et al.* (2009), Ozawa *et al.* (2012), Voutilainen *et al.*, (2006), relataram a aplicação da luteína na saúde humana para prevenções de alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares, melhoria dos sintomas iniciais da aterosclerose e algumas doenças provocadas na retina.

Os carotenoides são componentes bioativos de pigmentos, relevantes devido a sua diversidade estrutural e numerosas funções biológicas no organismo humano, tais como ação antioxidante. Estes compostos estão presentes em algas e são responsáveis por muitas das cores amarelo, laranja e vermelha, característica de frutas e flores, bem como a cor de alguns pássaros, insetos, e animais marinhos, por possuírem a propriedade de dissolverem-se bem em solventes não-polares (Cerón *et al.*, 2008; Nishino *et al.*, 2009; Ozawa *et al.*, 2012; Rao e Rao, 2007).

Várias funções são executadas pelos carotenoides nas microalgas. Estas vão desde a coleta de luz emitida pelo sol, passando pela contribuição para a estabilidade da sua estrutura até a função de complexos fotossintéticos (Guedes *et al.*, 2011). Pirastru *et al.* (2012) verificaram que as algas, quando submetidas a condições de stress, incluindo culturas com alta salinidade, aumentam a produção de carotenoides com alta atividade antioxidante. A atividade antioxidante intrínseca de carotenoides compõe a base para reagir ao estresse oxidativo.

Scenedesmus almeriensis é uma espécie de alga do género *Scenedesmus* altamente produtiva e de rápido crescimento, sendo também uma eficiente produtora de luteína junto a outros carotenoides, como o β -caroteno (Sánchez *et al.*, 2008a). Muitas espécies deste género estão sendo investigadas para fins industriais pois possuem altas taxas de crescimento e a habilidade de crescer em condições diversas (Fernández-Sevilla *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2008a; Sánchez *et al.*, 2008b). Esta espécie reúne muitos pré-requisitos para aplicações na área industrial e de futuras pesquisas. Além do alto teor de carotenoides, com destaque para a presença de luteína, ao ser exposta a condições de

estresse, apresentou adaptação ao meio: capacidade de crescimento em ampla faixa de pH e temperatura, resistência a salinidade e tolerância a altas concentrações de cobre (Limón *et al.*, 2015; Fernández-Sevilla *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2008b).

2.3. EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS

Nas últimas décadas, o estilo de vida trouxe mudanças nas tecnologias de processamento de alimentos e culinária. Desde a sua invenção e desenvolvimento, o uso do forno de micro-ondas aumentou constantemente tanto em casa como na indústria, principalmente devido às suas vantagens, que incluem a capacidade de transmitir rapidamente o calor pelo seu alto poder de penetração, conveniência, facilidade de uso e economia de tempo e energia. Outra razão para o aumento constante na utilização do forno de micro-ondas é a tendência na elaboração de produtos alimentares “pré-prontos” para descongelar, aquecer ou cozinhar com uso deste equipamento, facilitando a vida do consumidor (Malheiro *et al.*, 2011).

Diferentes trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos que o aquecimento por micro-ondas pode causar sobre os alimentos e seus componentes, tais como a fração lipídica de gorduras animais e óleos vegetais. O aquecimento por micro-ondas pode acelerar as reações de oxidação, que vem a promover os radicais livres no alimento, além de outros fatores como composição de ácidos gordos, ácidos gordos livres, presença de oxigênio, água, estado físico, luz, presença de metais na composição e antioxidantes (Ayadi *et al.*, 2009; Lalas e Dourtoglou, 2003; Malheiro *et al.*, 2013a; Malheiro *et al.*, 2013b; Malheiro *et al.*, 2012; Malheiro *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012).

Os principais meios de consumo de azeite incluem a aplicação direta em saladas ou como ingrediente em molhos, mas também vem sendo usado para cozinhar, seja em frituras ou cozimentos. Contudo, sob estresse térmico, alguns componentes não-glicerídicos do azeite podem ser degradados. Nunes *et al.* (2013) relataram que em altas temperaturas a composição sofre variadas modificações, como formação de compostos oxidados e alteração sensorial.

Segundo Malheiro *et al.* (2009), o processo de aquecimento diminui a qualidade do azeite quanto maior for a temperatura empregada, onde, acima de três minutos, a composição em clorofila, carotenoides e α -tocoferol são afetadas significativamente.

A adição de antioxidantes com alto teor em carotenoides, como o β -caroteno e a luteína, vem sendo explorada em estudos (Limón *et al.*, 2015), a fim de avaliar a influência da sua presença na composição do azeite e, posteriormente, fazer possível correlação com as alterações quando exposto ao aquecimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerando que o trabalho teve dois objetivos distintos, por um lado a caracterização de azeites varietais, extraídos de diferentes cultivares de oliveira; e por outro o estudo do efeito do aquecimento em micro-ondas de azeite virgem com adição e na ausência de extrato da alga *Scenedesmus almeriensis*, far-se-á uma pequena abordagem ao delineamento experimental de cada parte do trabalho, sendo as metodologias apresentadas em comum.

3.1. CARATERIZAÇÃO DE AZEITES ELEMENTARES

Para a caracterização de azeites elementares, foram colhidas azeitonas de diferentes cultivares, nomeadamente: Arbequina, Arbosana, Cobrançosa, Picual, Arroniz, Cornicabra, Manzanilla, Redondilla, Royuela, Frantoio, Hojiblanca, Picudo, e Zorzal. Para o caso da cv. Arbequina, foram obtidos diferentes lotes de azeitona, nomeadamente 3,5*1,5, 3*1,5, 4*1, 4*1,25, 4*1,5 e 4*2, que correspondem a diferentes densidades das árvores no campo. O olival de onde provieram as azeitonas localiza-se em Medina de Rio Seco, na província de Valladolid, Região de Castela e Leão, e é conduzido sobre a forma de olival superintensivo com uma elevada densidade de árvores por hectare, integrando uma parcela experimental do Instituto Tecnológico Agrário de Castela e Leão (ITACyL).

No final de novembro de 2014, de cada cultivar, foram recolhidos manualmente cerca de 3,0 kg de azeitonas, que foram colocados em caixas de plástico rígidas e transportados, no mais curto espaço de tempo, para o laboratório do Instituto Tecnológico Agrário de Castela e Leão, em Valladolid, Espanha, onde se procedeu à extração dos azeites. A extração foi feita em menos de 24 horas para preservar a integridade dos azeites.

A extração foi feita num sistema de extração tipo Abencor (Comercial Abengoa SA, Sevilha, Espanha), onde é simulado todo o processo de obtenção de azeite de uma linha industrial. Em seguida, procedeu-se à moenda das azeitonas, batedura, centrifugação das pastas e separação das diferentes fases, sólido-líquido e líquido-líquido. A batedura ocorreu à temperatura de 25 °C em “banho-maria” durante 30 minutos. Por forma a separar melhor o azeite da pasta de azeitona, 5 minutos antes do fim da batedura foram adicionados 100 mL de água morna à temperatura de 35 ± 5 °C. Após finalizada a batedura, a pasta foi centrifugada permitindo separar a fase líquida da

fase sólida por diferença de densidades. De seguida, pelo processo de decantação, ocorreu a separação das fases líquidas, permanecendo o azeite, na parte superior, das águas ruças, na parte inferior. Os azeites obtidos de cada uma das cultivares foram colocados em garrafas individuais, sendo posteriormente transportadas para o Laboratório de AgroBioTecnologia da Escola Superior Agrária de Instituto Politécnico de Bragança.

Antes de iniciar as análises de caracterização, os diferentes azeites foram filtrados com papel filtro na presença de sulfato de sódio anidro, de forma a remover possíveis impurezas e humidade que pudessem estar presentes. Após a filtração, as amostras contidas em garrafas de cor âmbar com capacidade para 500 mL e rolhadas, foram acondicionadas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz para evitar a ocorrência de fenómenos oxidativos, procedendo-se à análise dos diferentes parâmetros. Cada uma das determinações foi efetuada em duplicado.

Os diferentes azeites foram caracterizados no que respeita à sua qualidade, nomeadamente pela avaliação da acidez, índice de peróxido, coeficientes de extinção específica no ultravioleta (K_{232} , K_{270} e ΔK) e avaliação sensorial; composição química, nomeadamente no que respeita à sua composição em ácidos gordos, esteróis e em tocoferóis e tocotrienóis; atividade antioxidante, pela avaliação do teor em fenóis totais, resistência à oxidação pelo método Rancimat; efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH, efeito sequestrante de radicais ABTS e cor pelo método CIELAB..

3.2. EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS EM AZEITE VIRGEM COM E SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*

Para avaliar o efeito protetor da adição de extrato da microalga *S. almeriensis* no azeite virgem quando sujeito a aquecimento em micro-ondas, foi adicionado extrato a azeites que foram posteriormente sujeitos a aquecimento, da forma como a seguir se descreve.

Foi selecionado um azeite monovarietal Arbequina, a partir do qual foram constituídos três lotes. Cada um dos lotes formados foi subdividido em três amostras, de 40 mL, que sofreram os diferentes tratamentos em avaliação. O primeiro lote, denominado T_0 , corresponde ao tempo inicial em que o azeite não sofreu qualquer

tratamento nem adição de alga. O segundo lote, denominado T₅, foi subdividido em três amostras igualmente de 40 mL, e que foram sujeitas a aquecimento em micro-ondas. Ao terceiro lote, denominado T_{5EXT}, procedeu-se à adição de extrato de microalga *S. almerienis* e foi posteriormente aquecido em micro-ondas. Cada uma das amostras, e em cada tratamento, foi tratada individualmente constituindo desta forma uma repetição.

Previamente ao aquecimento em micro-ondas adicionou-se extrato de alga em concentração final de 0,1 mg/mL de azeite, dado que Limón *et al.* (2015) verificaram que a adição de maiores concentrações de extrato não altera significativamente os resultados. Uma vez que o extrato é de difícil dissolução, teve que se proceder à realização de um tratamento prévio. Assim num frasco rolhado com 250 mL de capacidade, foram colocados 120 mL de azeite ao qual se procedeu à adição de 2,4 mL de extrato, inicialmente a uma concentração de 5 mg/mL. De seguida e para melhor incorporação do extrato no azeite, a mistura foi levada a um agitador orbital na temperatura de 24 °C e a rotação de 200 rpm constantes, em escuro, durante 5 dias, período a partir do qual ocorreu completa dissolução.

Após o procedimento descrito, foram colocados individualmente 40 mL de azeite, das amostras T₅ e T_{5EXT}, em placas de Petri de 9 mm de diâmetro e 1 mm de altura. As placas foram colocadas destapadas e levadas individualmente ao aquecimento em micro-ondas (SOLAC) por 5 minutos em potência máxima (1000 Watts). Após aquecimento, as placas foram colocadas em ambiente fresco para arrefecimento e depois armazenadas em refrigeração.

Nos diferentes azeites, isto é, controlo sem aquecimento (T₀) e sujeitos a aquecimento, com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T₅), procedeu-se à avaliação dos seguintes parâmetros de qualidade: acidez, índice de peróxido, e coeficientes de extinção específica no ultravioleta (K₂₃₂, K₂₇₀ e ΔK); composição química, nomeadamente no que respeita à sua composição em ácidos gordos, esteróis e em tocoferóis e tocotrienóis; pigmentos; atividade antioxidante, pela avaliação da resistência à oxidação pelo método Rancimat; efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH, e efeito sequestrante de radicais ABTS; e cor pelo método CIELAB.

De seguida apresentam-se as metodologias usadas para a determinação dos diferentes parâmetros.

3.3. PARÂMETROS DE QUALIDADE

3.3.1. Acidez

A acidez foi determinada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. A cada ensaio foi utilizado a toma de, aproximadamente 3,0 g de azeite; que foi dissolvido em um erlenmeyer contendo 50 mL de uma solução (1:1) etanol/éter etílico. Posteriormente fez-se a titulação com uma solução hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína, até a mudança de cor amarelada para rosa ténue. A acidez, expressa em percentagem de ácido oleico livre, foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$Acidez (\%) = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

Onde:

V – volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

C – concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro;

M – massa molar do ácido oleico em g/mol;

m – massa da amostra em grama.

3.3.2. Índice de Peróxido

A determinação do índice de peróxido foi executada de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. A cada ensaio foi pesado a toma de, aproximadamente, 1,2 g e em seguida dissolveu-se em 15 mL de ácido acético glacial e 10 mL de clorofórmio juntamente com 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Depois de agitar por um minuto, tapou-se o erlenmeyer, deixando-o armazenado durante cinco minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Por fim, acrescentou-se 75 mL de água destilada e uma solução de cozimento de amido (1 g/100 mL) como indicador, titulando-se com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N, tendo-se realizado um ensaio em branco. Os valores de índice de peróxido expressos em miliequivalentes de oxigénio ativo por kg de azeite foram calculados de acordo com a equação:

$$\text{Índice de Peróxido} \left(\text{mEq.} \frac{O_2}{\text{kg}} \right) = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

Onde:

V – volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação, tendo em conta o ensaio do branco;

N – normalidade exata da solução tiosulfato de sódio;

m – massa da amostra em grama.

3.3.3. Espectrofotometria no Ultravioleta

A análise de absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Em aproximadamente 0,6 g de toma de amostra foram dissolvidos 10 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), determinando-se em seguida, em cuvette de quartzo de percurso ótico de 1 cm, o coeficiente de extinção da solução nos comprimentos de onda prescritos (232 a 276 nm) em relação ao iso-octano no seu estado puro. As leituras de absorvância foram efetuadas num espectrofotômetro UV/Visível modelo Genesys™ 10. Os valores das absorvâncias foram expressos em termos de extinção específica, designada por ΔK (coeficiente de extinção). Os coeficientes de extinção a 232 nm, 270 nm, e ΔK foram calculados da seguinte forma:

$$K_{232} = \frac{A_{232}}{c \times l}$$

$$K_{270} = \frac{A_{270}}{c \times l}$$

$$\Delta K = K_{270} \frac{A_{266} + A_{274}}{2}$$

Onde:

A_{232} , A_{266} , A_{270} e A_{274} são as absorvância para respetiva onda;

c – concentração do azeite em g/100 mL;

l – percurso ótico (1 cm).

3.3.4. Análise sensorial

Os azeites elementares foram submetidos a avaliação organolética conforme os métodos e normas aprovadas pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) para análise sensorial de azeites, nomeadamente COI/T.20/Doc. nº 15/Rev.6 e COI/T.30/Doc. nº 17. Para a realização das provas, foi utilizado um painel treinado, composto por dois provadores aptos a classificar as amostras de azeites em uma escala de acordo com sensações olfactivas, sensações retronasal-gustativas e sensações finais olfacto-gustativas. Para as sensações olfactivas, os seguintes atributos foram medidos: frutado verde-oliva (0-7), outros frutos (0-3), verde (grama/folhas) (0-2), outras sensações positivas (0-3) e harmonia (0-20). Em relação as sensações retronasal-gustativas, foram avaliados o sabor frutado verde-oliva (0-10), doce (0-4), amargo (0-3), picante (0-3), verde (grama/folhas) (0-2), outras sensações positivas (0-3) e harmonia (0-20). A sensação final olfacto-gustativa também foi considerada para cada amostra, conjugando todas as sensações organoléticas, apontando a complexidade (0-10) e persistência (0-10). Deve notar-se que a harmonia aumenta quando os atributos são equilibrados, e a complexidade aumenta com o número e intensidade de aromas e sabores. Na elaboração do perfil sensorial, as amostras dos azeites elementares em estudo foram avaliadas pelo painel em duplicado.

3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.4.1. Composição em ácidos gordos

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) no 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Os ácidos gordos, assim como os seus ésteres metílicos, foram avaliados recorrendo à transesterificação direta a frio, com hidróxido de potássio metanólico e extração com n-heptano. A toma de duas gotas de amostra foi dissolvida em 2 mL de n-heptano, 100 µL de padrão interno TriC11 (20 mg/mL de n-heptano), 200 µL de hidróxido de potássio preparado em metanol e fosfato de sódio.

O perfil em ácidos gordos foi determinado com um cromatógrafo gasoso (GLC) Chrompack, modelo CP-9001, com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split de 1:50 e volume de injeção de 1 µL, injetor com detetor de ionização por

chama (FID), amostrador automático modelo Chrompack CP-9050 e uma coluna de sílica fundida com fase estacionária CP-Sil 88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25 mm x 0,19 µm. O gás de arrasto utilizado foi o Hélio com uma pressão de 110 kPa. As temperaturas do detetor e do injetor eram de 250 °C e 230 °C, respetivamente, com uma relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 µL. Os resultados foram expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico e eluído entre os ésteres mirístico, linocérico e metílico. Para identificação e calibração (Sigma-Aldrich[®], Espanha) foram utilizados uma amostra controlo (Olive oil 47118, Supelco) e uma mistura padrão de éster metílico de ácido gordo (Supelco 37 FAME Mix).

A separação dos ácidos gordos foi efetuada numa coluna WCOT (Wall Coated Open Tubular) de sílica fundida com fase estacionária CP Sil-88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25 mm x 0,19 µm. Foi utilizado como gás de arrasto o Hélio, com pressão interna de 140 kPa. As temperaturas do injetor, da coluna e do detetor eram 230 °C, 185 °C e 250 °C, respetivamente. A recolha e o tratamento dos dados foram realizados pelo programa CP Maitre Chromatography Data System, Version 2.5 (Chrompack International B. V.).

Os resultados foram também expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico e eluído entre os ésteres mirístico, linocérico e metílico. Uma amostra controlo (Olive oil 47118, Supelco) e uma mistura padrão de éster metílico de ácido gordo (Supelco 37 FAME Mix) foram utilizados para identificação e calibração (Sigma-Aldrich[®], Espanha).

3.4.2. Composição em tocoferóis e tocotrienóis

A concentração de vitamina E foi obtida por determinação do teor de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), segundo a norma ISO 9936:2006, com algumas modificações descritas por Casal *et al.* (2010).

Em uma toma de amostra de, aproximadamente, 100 mg, foram adicionados 10 µL de 2-metil-2-(4,8,12-trimetilridecil)-croman-6-ol (tocol) (Matreya Inc., USA) e fez-se o volume até 1 mL com n-hexano. O padrão de tocoferóis (α-, β- e γ-) foi adquirido de Supelco (USA).

O cromatógrafo consistia num sistema integrado Jasco DG-2080-53 (Japão), e um detector de Fluorescência (Jasco FP-2020 Plus, Japão), programado para ser excitado a 290 nm e emitir a 330 nm. A separação cromatográfica foi conseguida através de uma coluna Supelcosil™ (LC-SI; 75 cm x 3,0 mm; 3 µm) (Sigma-Aldrich, Alemanha), operando à temperatura constante de 22 ± 2 °C. O sistema isocrático era composto por uma fase móvel, com uma mistura de 1,4-dioxano em n-hexano (2,5%, v/v) num caudal de 0,70 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL.

Os dados foram analisados com o controle ChromNAV Center, Jasco Chromatography Data Station (Japão), sendo os resultados expressos em mg por kg de azeite.

3.4.3. Composição em esteróis

A determinação dos esteróis foi realizada por cromatografia gasosa e deteção por ionização em chama (GC/FID), de acordo com Cunha *et al* (2006). Os padrões de colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol, β-sitosterol, β-sitostanol e a betulina foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, USA). Os reagentes de derivatização, 1-metilimidazol e N-metil-N-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA) foram fornecidos pela Sigma e Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), respetivamente. As placas de sílica e o óxido de alumínio 90 padronizado foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Os restantes reagentes utilizados tinham grau de pureza “Pro analysis”.

A preparação das amostras para a análise dos esteróis foi igual à utilizada para os ácidos gordos e tocoferóis, tendo sido usadas as mesmas extrações de gordura para ambas as análises. Após a adição de 1 mL de betulina (1,0 mg/mL em acetona) como padrão interno a 500 mg de cada amostra pesadas rigorosamente, procedeu-se à saponificação das amostras com 10 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 0,5 M. A fração insaponificável foi obtida por extração em fase sólida com uma coluna de óxido de alumínio. Após eluição com 5 mL de etanol e 30 mL de éter etílico, procedeu-se à concentração do extrato. A fração correspondente aos esteróis totais foi isolada por cromatografia em camada fina, utilizando placas de sílica e n-hexano/éter dietílico (1:1, v/v) como eluente. As bandas separadas foram visualizadas e marcadas após aspersão com metanol, e os compostos foram extraídos (3 vezes) da sílica

removida com 1 mL de álcool seguido de 5 mL de éter dietílico. O extrato foi transferido para um pequeno frasco com fundo cônico e levado à secura em corrente de azoto. Procedeu-se em seguida à sua derivatização. Para tal adicionaram-se 100 mL da mistura de 1-metilimidazol e N-metil-N-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA) (50 mL + 1 mL, respetivamente), selaram-se os frascos e aqueceu-se a 105 °C durante 15 min. O conteúdo dos frascos foi depois analisado por GC/FID e a identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões.

O cromatógrafo gasoso utilizado foi o mesmo usado para determinar os ácidos gordos, mas com coluna capilar diferente. Para separação dos esteróis, utilizou-se uma coluna CP-Sil DB 5 MS, (30m x 0,25mm x 0,25µm; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). As condições analíticas definidas foram: temperaturas do injetor e detetor 320 °C; temperatura da coluna: programada para aumentar de 250 °C a 300 °C à velocidade de 2 °C/min, e permanecer a 300 °C durante 12 min; relação de “split”: 1:50; gás vetor: hélio, à pressão interna inicial de 100kPa; volume de injeção: 1,5 mL. O teor em esteróis foi expresso em mg por 100 g de óleo.

3.4.4. Composição em pigmentos

Os extratos foram preparados de acordo com Achir *et al.*, (2010). Resumidamente, adicionou-se padrão interno β -apo-carotenal (Sigma-Aldrich, Alemanha) a uma toma de 200 mg de azeite, para cada amostra, misturados com 2 mL de acetona, agitada em vórtex durante 10 s seguido de repouso, durante a noite a -20 °C, para a cristalização do triacilglicerol. Os triacilgliceróis foram separados por amostragem rápida, seguida por centrifugação a 13.000 rpm. Estes passos foram omitidos na análise das amostras adicionadas de extrato de *S. almeriensis*, sendo diretamente diluída em acetona após a adição do padrão interno. O extrato foi injetado em HPLC, diretamente na coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 3,5 mm de diâmetro interno) a 23 °C e eluiu-se com um gradiente linear de 30 min a partir de 80% metanol aquoso (v/v) contendo 0,05% de trietilamina e 20% de acetato de etilo (contendo 0,05% de trietilamina) a 1 mL/min. A análise foi realizada no mesmo equipamento de HPLC descrito para os protocolos, exceto pela utilização de um detetor DAD (JASCO MD-2015-Plus, Japão).

3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1. Teor em fenóis totais

A composição em fenóis totais foi determinada pelo método utilizado por Capannesi *et al.* (2000), com algumas modificações. Para a reta de calibração preparou-se uma solução mãe de ácido cafeico de concentração 2 mg/mL, onde as soluções padrão diluídas se encontravam num intervalo de concentrações de 0,04 a 0,18 mg/mL. Após preparação das soluções, foram adicionados para tubos de 10 mL, 1 mL dessa solução, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de uma solução de carbonato de sódio (7,5%), perfazendo-se o tubo com água deionizada. A mistura foi refrigerada durante a noite (≈ 12 h), após a qual foi centrifugada e efetuadas as leituras a $\lambda = 765$ nm.

Para a extração dos fenóis totais pesaram-se para cada amostra, aproximadamente, 2,5 g de azeite, que foram dissolvidos em 2,5 mL de n-hexano e extraídos três vezes por centrifugações de 5 minutos a 5000 rpm com 2,5 mL de uma mistura de 80% de metanol e 20% de água (v/v). Após a centrifugação, retirou-se 1 mL de extrato e adicionou-se a este 1 mL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de Na_2CO_3 (7,5%) e 7 mL de água deionizada. A mistura foi refrigerada durante a noite (≈ 12 h), e em seguida foi centrifugada e então efetuadas as leituras num espectrofotômetro UV/Visível modelo Genesys™ a $\lambda = 765$ nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido cafeico por kg de azeite.

3.5.2. Estabilidade oxidativa

A estabilidade à oxidação foi avaliada pelo método de condutividade (Rancimat 743, Methrom Ltd., Suíça), descrita por Malheiro *et al.* (2012). É um processo que consiste em fazer borbulhar uma corrente de ar, filtrada, limpa e seca (20 L/h) através de uma toma de amostra (3,0 g) aquecida a $120 \pm 1,6$ °C. Os compostos de oxidação formados ao longo do tempo, mais polares que os triglicéridos, tais como hidroperóxidos, álcoois e compostos carbonílicos, são arrastados pelo fluxo de ar e borbulham posteriormente numa solução aquosa. Nesta solução está imerso um eletrodo que mede a sua condutividade. O aparelho efetua as análises automaticamente e

continuamente, só podendo interromper-se a operação quando, para cada amostra, a condutividade medida atinge o seu máximo (300 μ S/cm).

O cálculo dos tempos de estabilidade oxidativa das amostras é feito pelo programa informático, associado ao aparelho, pelo traçado das tangentes à curva obtida. O intervalo de tempo compreendido entre o início do registo e o ponto de intersecção das tangentes à curva, corresponde ao chamado “período de indução”. Os resultados foram expressos em horas.

3.5.3. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH $^{\bullet}$)

A avaliação da atividade sequestradora foi realizada pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) de acordo com a metodologia descrita por Malheiro *et al.* (2012). Uma solução de aproximadamente 1 g de azeite em acetato de etilo (10% m/v), foi adicionada de 4 mL de uma solução recém preparada de DPPH (1×10^{-4} M em acetato de etilo) em um tubo de 15 mL. A mistura foi agitada vigorosamente e deixou-se repousar no escuro durante 30 minutos. Posteriormente, fez-se as leituras num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ a $\lambda = 515$ nm e os resultados foram expressos em percentagem de inibição.

3.5.4. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS $^{\bullet+}$)

A formação do radical ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfónico)] é a base de um dos métodos espectrofotométricos que tem sido aplicado para a medição da atividade antioxidante total das soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. Este método permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O método foi descrito por Re *et al.* (1999), com base na capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS. A reação química do ABTS $^{\bullet+}$ com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), permite a formação dos radicais ABTS.

Assim, para esta técnica, o ABTS (7mM) foi enriquecido com K₂S₂O₈ (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas. A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma absorvância a $\lambda = 734$ nm de $0,70 \pm 0,02$. A reação foi conduzida diretamente na cuvete de quartzo, com a adição de 2 mL de ABTS (Branco) e de 100 μ L de amostra ou padrão. Os valores de

absorvância são inversamente proporcionais à quantidade de antioxidantes presentes nas nossas amostras. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ e os resultados expressos em percentagem de inibição.

3.6. COLORIMETRIA

A medição da cor dos azeites, sujeitos a aquecimento ou não, foi realizada diretamente pela leitura das coordenadas CIELAB (L^* , a^* e b^*) nas amostras, utilizando um colorímetro de modelo CR-400 Konica Minolta, em duplicado, à temperatura ambiente e a um ângulo de 0 °C. Antes da medição, o colorímetro foi calibrado por uma cerâmica branca. As diferenças de cor (ΔE) entre as amostras de controlo, consideradas como padrão (não sujeitas a aquecimento) e as amostras sujeitas ao aquecimento foram calculadas a partir das coordenadas dadas, bem como índice de amarelecimento (YI) como descrito por Zamora *et al.* (2004):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$YI = \frac{142.86 \times b^*}{L^*}$$

Onde:

L^* é a medida da luminância, que varia de 0 a 100 (preto a branco);

a^* varia de negativo para positivo (verde para vermelho);

b^* também varia de negativo para positivo (azul para amarelo).

3.7. ANÁLISE DE DADOS

Após a aquisição dos dados referentes as análises de parâmetro de qualidade, colorimetria, composição química e atividade antioxidante, os resultados foram organizados na forma de matrizes de dados. Os dados de todas as análises foram organizados de forma que as amostras ficassem dispostas em linhas enquanto que as colunas contivessem as variáveis.

Foram empregados métodos quimiométricos, Análise de Componentes Principais, para avaliar as semelhanças entre as amostras. Para isso, foi utilizado software Matlab 8.1®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. CARACTERIZAÇÃO DE AZEITES ELEMENTARES

4.1.1. Parâmetros de qualidade

A qualidade do azeite é definida por um conjunto de parâmetros que permitem classificar o azeite virgem, na categoria comercial, devendo para tal obedecer aos parâmetros que constam do Regulamento (CEE) nº 1348/2013 da Comissão Europeia de 16 de Dezembro de 2013. No Quadro 3 são apresentados os valores médios resultantes das determinações realizadas para a acidez, índice de peróxido e espectrofotometria na região do ultravioleta, dos diferentes azeites elementares. Estes dados demonstram a elevada qualidade dos azeites testados, com valores que os permitem classificar na categoria de azeite virgem extra.

Quadro 3. Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez total (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O₂/kg); K₂₃₂; K₂₇₀ e ΔK] dos azeites elementares (média e desvio padrão).

Cultivar	Acidez Total	Índice de Peróxidos (mEq.O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
Arbequina 3*1,5	0,2 ± 0,0	5,79 ± 0,61	1,27 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Arbequina 3,5*1,5	0,1 ± 0,0	4,57 ± 0,59	1,36 ± 0,10	0,18 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Arbequina 4*1	0,2 ± 0,0	3,73 ± 0,58	1,50 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Arbequina 4*1,25	0,2 ± 0,0	4,14 ± 0,01	1,09 ± 0,20	0,10 ± 0,04	0,00 ± 0,00
Arbequina 4*1,5	0,2 ± 0,00	3,73 ± 0,59	1,49 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Arbequina 4*2	0,2 ± 0,0	2,90 ± 0,57	1,95 ± 0,13	0,22 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Arbosana	0,3 ± 0,0	4,97 ± 0,00	1,19 ± 0,11	0,13 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Arroniz	0,2 ± 0,0	4,57 ± 0,60	1,33 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,00 ± 0,01
Cobrançosa	0,2 ± 0,0	5,40 ± 0,60	1,40 ± 0,11	0,15 ± 0,04	0,01 ± 0,00
Cornicabra	0,3 ± 0,0	3,75 ± 0,59	1,67 ± 0,22	0,21 ± 0,00	0,01 ± 0,01
Frantoio	0,2 ± 0,0	3,74 ± 0,58	1,51 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Hojiblanca	0,2 ± 0,0	5,41 ± 0,58	1,70 ± 0,28	0,18 ± 0,04	0,01 ± 0,00
Manzanilla	0,2 ± 0,0	4,57 ± 0,59	1,34 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Picual	0,3 ± 0,0	7,08 ± 0,59	1,11 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,00 ± 0,00
Picudo	0,3 ± 0,0	9,14 ± 0,00	1,37 ± 0,07	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Redondilla	0,3 ± 0,0	4,16 ± 0,01	1,52 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Royuela	0,3 ± 0,0	4,58 ± 0,59	1,58 ± 0,07	0,22 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Zorzal ITA	0,3 ± 0,0	7,48 ± 0,03	1,75 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,01 ± 0,00

4.1.1.1. Acidez

A acidez é a medida da quantidade de ácidos gordos livres, expressa em percentagem de ácido oleico presente em 100 gramas de amostra. Uma grande

quantidade de ácidos gordos na forma livre indica-nos que a matéria prima que origina o azeite, isto é, as azeitonas, sofreram processos de degradação e/ou fermentação que levaram ao desenvolvimento de processos de hidrólise dos triacilgliceróis, originando ácidos gordos livres. Assim, a acidez não tem qualquer relação com o sabor, mas com fatores que incluem ataque de pragas e doenças, contacto prolongado da água com o azeite, além de estar relacionada a métodos de colheita, transporte, armazenamento e extração descuidados.

Os azeites objecto deste estudo apresentaram valores de acidez no intervalo de 0,1 a 0,3% (Quadro 3), muitíssimos quais são considerados baixos quando comparados com a generalidade dos azeites comerciais. Lembra-se que para este parâmetro os azeites classificados como virgem extra poderão ter uma acidez máxima de 0,8% enquanto que, para aqueles classificados na categoria de azeite virgem, esse valor pode chegar aos 2%.

4.1.1.2. Índice de Peróxido

Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite que levam à formação do ranço, podendo afetar negativamente o seu valor nutricional. O valor de índice de peróxidos é proporcional ao estado de oxidação que se encontra o azeite, indicando o seu estado de deterioração.

Os resultados para índice de peróxido, de uma maneira geral, foram relativamente baixos. A variação deste parâmetro para a cv. Arbequina apresentou valores entre 2,90 a 5,79 mEq.O₂/kg, os quais devem estar relacionados as diferentes densidades de plantio em que as azeitonas desta cultivar são produzidas. Allalout *et al* (2009), durante caracterização de azeites virgens obtidos por sistema denominado super intensivo, em que existe um elevado número de árvores por hectare, relataram valores de 3,20 a 3,55 mEq.O₂/kg para a cv. Arbequina. Os azeites elementares das outras cultivares tiveram uma variação entre 3,74 a 9,14 mEq.O₂/kg, estando dentro do limite estabelecido pelo Regulamento Europeu 1348/13 (20 mEq.O₂/kg) para a categoria de azeites virgem extra e azeites virgem. Outro fator a ser considerado na explicação destes teores está relacionado as condições de armazenamento, o qual influencia significativamente na estabilidade do azeite, e que pode estar relacionado ao baixo índice de peróxido encontrado para os azeites desta cultivar.

4.1.1.3. Espectrofotometria no Ultravioleta

A análise espectrofotométrica na região do UV fornece informações sobre a qualidade de um óleo, sobre seu estado de conservação e sobre alterações causadas pelo seu processamento. Os coeficientes de extinção específicos, K_{232} e K_{270} , são parâmetros utilizados para se determinar a pureza, estado de conservação e o grau de oxidação do azeite, complementando as observações para o índice de peróxido. Estes coeficientes são indicativos da conjugação de trienos (K_{232}) e da presença de compostos carbonílicos (K_{270}). Quando estes valores ultrapassam o limite determinado pelos órgãos regulamentadores, os quais são previstos para cada categoria de azeite, podem indicar a presença de azeites de baixa qualidade, que sofreram adulterações como componentes anormais adicionados, além de sugerirem uma aceleração no processo de degradação do azeite.

De acordo com o Regulamento (CEE) nº 1348/13, os valores de K_{232} para a categoria de azeite virgem extra e azeite virgem deverão ser inferiores a respectivamente 2,50 e 2,60, enquanto para o K_{270} esses valores não podem exceder 0,22 e 0,25, respectivamente, para azeite virgem extra e azeite virgem.

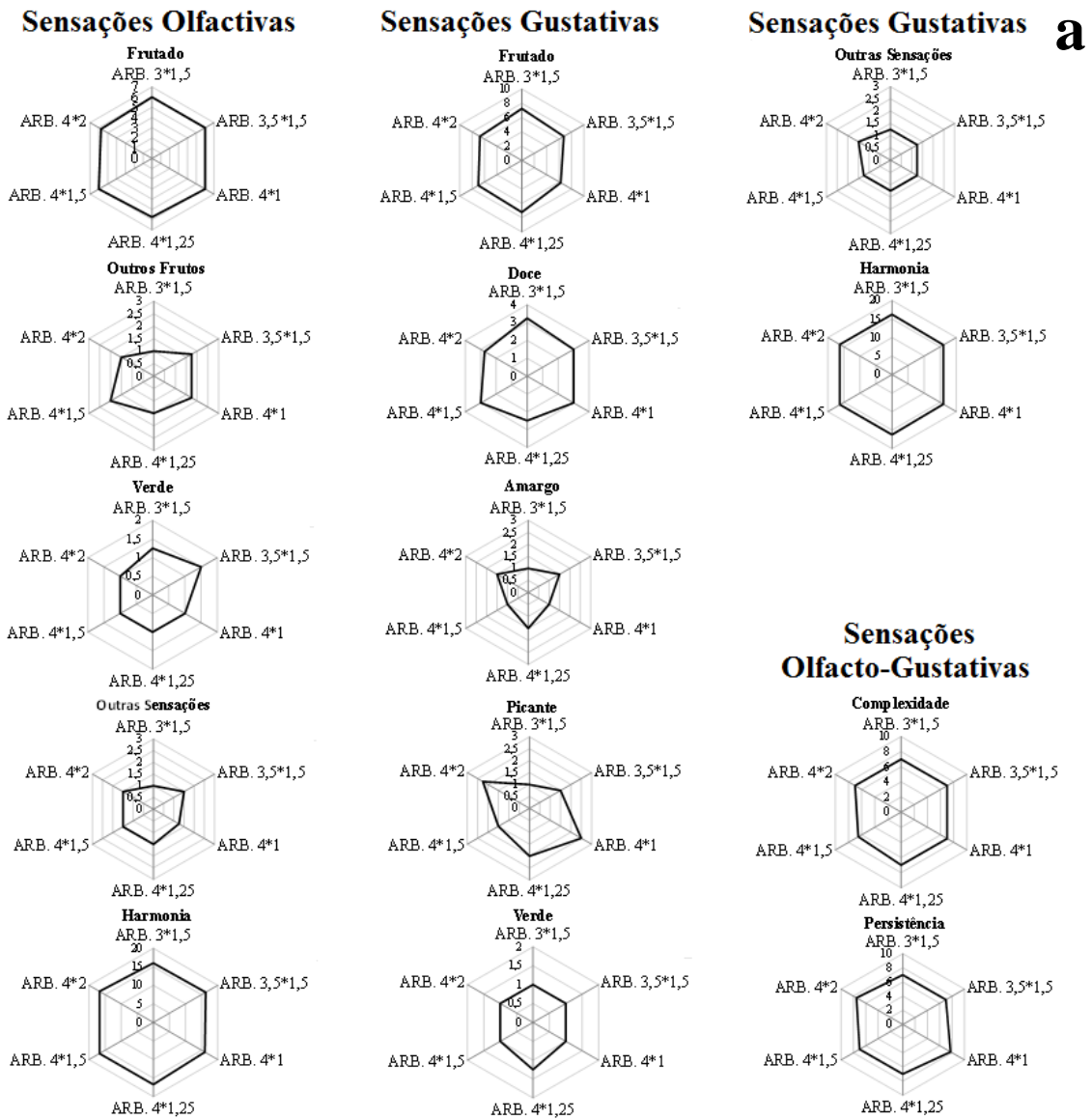
Assim como no índice de peróxidos, o K_{232} também é um parâmetro relacionado com a presença de produtos de oxidação primária. A cv. Arbequina apresentou valores entre 1,09 a 1,95 para K_{232} , e entre 0,10 a 0,22 para K_{270} , além de densidades $4 \times 1,25$ e 4×2 , respectivamente. Dentre os azeites elementares, a cv. Picual apresentou o menor valor para K_{232} , 1,1, enquanto que, para a cv. Zorzal ITA, o valor para K_{232} foi de 1,75. Desta forma, podemos sugerir que os azeites destas cultivares apresentaram estabilidade oxidativa adequada.

Na avaliação do K_{270} , que está relacionada com a presença de produtos secundários, os valores obtidos foram inferiores ao limite estabelecido pelo Regulamento (CEE) nº 1348/13 para azeites virgem extra e azeites virgem. As cvs. Arroniz e Royuela apresentaram os valores extremos para este parâmetro, sendo eles 0,12 e 0,22, respectivamente, dentre os azeites elementares.

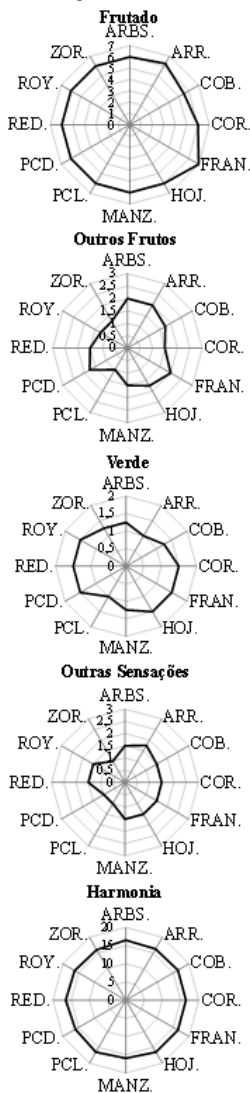
4.1.1.4. Análise sensorial

A análise sensorial permite determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos. Além disso, é um tipo de análise de grande importância para o

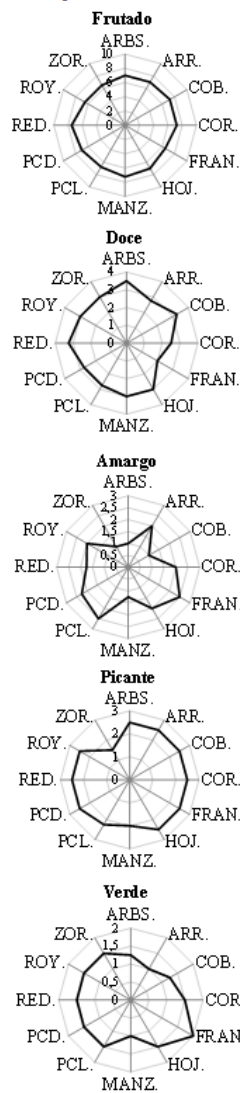
consumidor, uma vez que permite a avaliação no que diz respeito a aceitação de um produto. Na Figura 6 encontram-se traçados os perfis sensoriais da cv. Arbequina obtida de lotes com diferentes densidades (Figura 6a) e dos azeites elementares das restantes cultivares estudadas (Figura 6b).



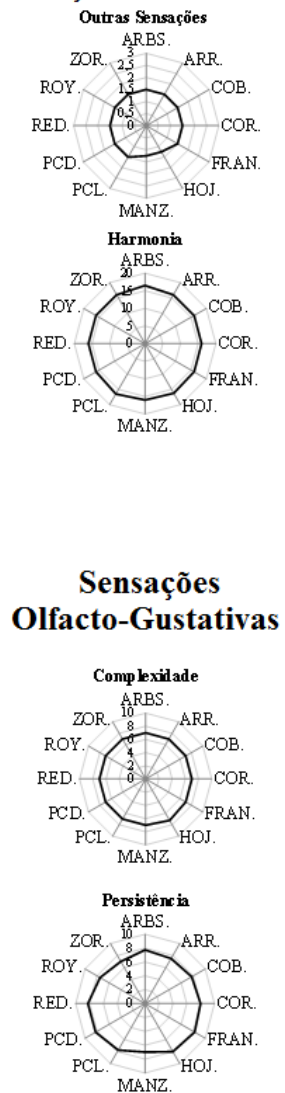
Sensações Olfactivas



Sensações Gustativas



Sensações Gustativas **b**



Sensações Olfacto-Gustativas

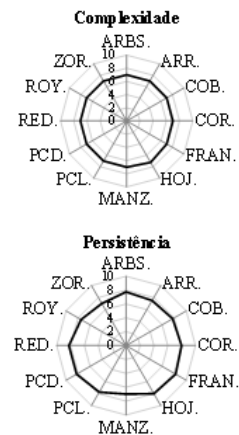


Figura 6. Perfil Sensorial dos azeites da cv. Arbequina (ARB) (a) e dos azeites elementares das restantes cultivares (ARBS: cv. Arbosana; ARR: cv. Arroniz; COB: cv. Cobrançosa; COR: cv. Cornicabra; FRAN: cv. Frantoio; HOJ: cv. Hojiblanca; MANZ: cv. Manzanilla; PCL: cv. Picual; PCD: cv. Picudo; RED: cv. Redondilla; ROY: cv. Royuela; ZOR: cv. Zorzal ITA) (b).

A comparação por análise quantitativa descritiva dos dados sensoriais médios permite uma maior visualização do perfil sensorial dos azeites das várias cultivares simultaneamente. Os azeites da cv. Arbequina, obtida em diferentes densidades, apresentaram variação relativamente pequena no perfil sensorial. Para as sensações olfactivas, a amostra de densidade 3,0*1,5 apresentou as menores notas de outros frutos e outras sensações e uma maior nota de verde, juntamente com a amostra de densidade 3,5*1,5. Em relação as notas de frutado, a amostra de densidade 4*1,25 apresentou a menor nota, porém, foi caracterizada como apresentando uma maior harmonia. Para as

sensações gustativas, a densidade de 4*1,25 apresentou maiores notas em frutado, amargo e verde, juntamente com uma maior harmonia. A amostra de densidade 4*1 apresentou menor nota para frutado, maior nota picante e nas sensações olfacto-gustativas maior persistência. Com exceção da amostra de densidade 4*1,15, todas as restantes apresentaram complexidade para sensações olfacto-gustativas.

Por sua vez, os azeites das outras cultivares mostram mais diferenças dentro das sensações olfativas, sendo os azeites das cvs. Frantoio e Picual aqueles que mais se diferenciaram. Com base nas sensações gustativas, verificou-se que os azeites provenientes de cvs. Arbosana, Frantoio e Manzanilla foram os que mostraram as maiores diferenças. Por fim, nas sensações olfacto-gustativas, as cvs. Zorzal e Manzanilla apresentaram menor persistência.

4.1.2. Composição química

4.1.2.1. Composição em ácidos gordos

Todos os detalhes sobre o perfil em ácidos gordos são dados nos Quadro 4 e 5, para os azeites da cv. Arbequina (Quadro 4) e para os azeites elementares das restantes cultivares (Quadro 5).

O ácido gordo mais representativo invariavelmente foi o ácido oleico (C18:1), variando entre 77,66 e 78,70% dos ácidos gordos totais para os azeites da cv. Arbequina, e entre 74,60 e 83,43% para o azeite das restantes cultivares, onde a cv. Manzanilla foi o que apresentou o teor mais elevado (83,43%), enquanto o oposto foi observado para o azeite da cv. Zorzal (Quadro 5). Existe uma relativa homogeneidade em algumas cultivares visto haver vários azeites com valores entre os 77 e os 79%.

O ácido palmítico (C16:0) foi o segundo mais abundante, seguido de ácido linoléico (C18:2) e ácido esteárico (C18:0). A variação do ácido palmítico não foi assinalável entre os azeites das diferentes cultivares, apresentando teores entre 9,45 a 10,31% dos ácidos gordos totais para a cv. Arbequina, e entre 8,78 a 10,37% para o restante das cultivares. De um modo geral, os azeites das diferentes cultivares apresentaram uniformidade no teor de ácido palmítico presente. Para os ácidos linoleico e esteárico a cv. Manzanilla apresentou os menores teores, sendo 2,91% e 1,71% dos ácidos gordos totais, respetivamente. Por outro lado, a cv. Arbequina de densidade 4*2 apresentou os maiores teores dentre os azeites da cv. Arbequina, enquanto as cvs. Zorzal

ITA e Cobrançosa se destacaram dentre os azeites elementares para os ácidos linoleico e esteárico, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com o previsto em trabalhos anteriores (Reboredo-Rodríguez *et al.*, (2015); Farinelli e Tombesi (2015); Medina *et al.* (2015); Allalout *et al.* (2009); Tovar *et al.* (2001)).

Quadro 4. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites da cv. Arbequina (média \pm desvio padrão).

	Arbequina 3*1,5	Arbequina 3,5*1,5	Arbequina 4*1	Arbequina 4*1,25	Arbequina 4*1,5	Arbequina 4*2
C16:0	10,31 \pm 0,31	10,11 \pm 0,70	9,94 \pm 0,20	9,45 \pm 0,26	9,45 \pm 0,26	9,67 \pm 0,00
C16:1	0,65 \pm 0,07	0,60 \pm 0,02	0,58 \pm 0,01	0,56 \pm 0,01	0,56 \pm 0,01	0,58 \pm 0,06
C17:0	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00
C17:1	0,26 \pm 0,05	0,23 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,26 \pm 0,00	0,26 \pm 0,00	0,25 \pm 0,01
C18:0	2,03 \pm 0,10	2,07 \pm 0,04	2,18 \pm 0,03	2,23 \pm 0,03	2,23 \pm 0,03	2,24 \pm 0,12
C18:1	77,66 \pm 0,19	78,04 \pm 0,75	78,31 \pm 0,12	78,70 \pm 0,16	78,70 \pm 0,16	78,47 \pm 0,14
C18:2C	6,91 \pm 0,15	6,80 \pm 0,05	6,45 \pm 0,09	6,57 \pm 0,06	6,57 \pm 0,06	6,94 \pm 0,33
C18:3n3	0,64 \pm 0,02	0,61 \pm 0,01	0,69 \pm 0,03	0,67 \pm 0,01	0,66 \pm 0,03	0,33 \pm 0,37
C20:0	0,49 \pm 0,01	0,53 \pm 0,01	0,57 \pm 0,07	0,53 \pm 0,02	0,55 \pm 0,03	0,54 \pm 0,01
C20:1n9	0,40 \pm 0,03	0,38 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01	0,41 \pm 0,03	0,40 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01
C22:0	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00	0,17 \pm 0,01	0,20 \pm 0,06	0,17 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01
C24:0	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00
SFA	13,27 \pm 0,21	13,15 \pm 0,72	12,76 \pm 0,06	13,12 \pm 0,10	12,68 \pm 0,21	12,90 \pm 0,15
MUFA	79,65 \pm 0,22	79,89 \pm 0,75	80,49 \pm 0,05	80,17 \pm 0,10	80,49 \pm 0,16	80,27 \pm 0,19
PUFA	7,56 \pm 0,17	7,40 \pm 0,05	7,11 \pm 0,09	7,12 \pm 0,08	7,24 \pm 0,08	7,27 \pm 0,04

Quadro 5. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites elementares de diferentes cultivares (média \pm desvio padrão expressos em percentagem).

	Arbosana	Arroniz	Cobrançosa	Cornicabra	Frantoio	Hojiblanca	Manzanilla	Picual	Picudo	Redondilla	Royuela	Zorzal ITA
C16:0	9,51 \pm 0,24	9,51 \pm 0,12	10,37 \pm 0,17	8,78 \pm 0,17	9,62 \pm 0,27	9,28 \pm 0,21	9,17 \pm 0,08	9,90 \pm 0,18	9,95 \pm 0,26	10,19 \pm 0,40	9,01 \pm 0,23	9,85 \pm 0,44
C16:1	0,72 \pm 0,01	0,52 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,56 \pm 0,01	0,57 \pm 0,01	0,44 \pm 0,00	0,62 \pm 0,00	0,38 \pm 0,04	0,68 \pm 0,04	0,87 \pm 0,03	0,52 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01
C17:0	0,14 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,11 \pm 0,05	0,14 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,20 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
C17:1	0,31 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	0,23 \pm 0,02	0,08 \pm 0,00
C18:0	2,03 \pm 0,05	2,02 \pm 0,04	3,00 \pm 0,05	2,44 \pm 0,05	1,86 \pm 0,01	2,58 \pm 0,04	1,71 \pm 0,04	2,32 \pm 0,08	2,33 \pm 0,04	1,82 \pm 0,05	2,16 \pm 0,02	2,54 \pm 0,06
C18:1	80,98 \pm 0,18	79,14 \pm 0,16	77,43 \pm 0,19	82,77 \pm 0,07	79,18 \pm 0,12	79,02 \pm 0,08	83,43 \pm 0,38	77,52 \pm 0,45	77,90 \pm 0,19	75,94 \pm 0,29	78,82 \pm 0,14	74,60 \pm 0,23
C18:2C	4,10 \pm 0,07	6,49 \pm 0,04	5,59 \pm 0,03	3,11 \pm 0,03	6,50 \pm 0,06	5,90 \pm 0,06	2,91 \pm 0,02	6,64 \pm 0,18	6,14 \pm 0,07	8,97 \pm 0,11	7,26 \pm 0,06	10,11 \pm 0,06
C18:3n3	0,75 \pm 0,02	0,73 \pm 0,01	1,11 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01	0,69 \pm 0,01	0,97 \pm 0,01	0,65 \pm 0,04	1,21 \pm 0,02	1,14 \pm 0,02	0,81 \pm 0,01	0,72 \pm 0,02	1,11 \pm 0,02
C20:0	0,53 \pm 0,03	0,44 \pm 0,03	0,54 \pm 0,02	0,58 \pm 0,04	0,47 \pm 0,02	0,53 \pm 0,03	0,44 \pm 0,04	0,52 \pm 0,02	0,53 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03
C20:1n9	0,43 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01	0,36 \pm 0,02	0,40 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03	0,35 \pm 0,01	0,39 \pm 0,04
C22:0	0,20 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,14 \pm 0,00	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,14 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
C24:0	0,13 \pm 0,02	0,09 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,06	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,03
SFA	12,56 \pm 0,20	12,35 \pm 0,13	14,36 \pm 0,23	12,17 \pm 0,05	12,34 \pm 0,21	12,83 \pm 0,13	11,67 \pm 0,12	13,28 \pm 0,25	13,30 \pm 0,23	12,76 \pm 0,31	11,94 \pm 0,19	13,18 \pm 0,32
MUFA	83,19 \pm 0,15	80,80 \pm 0,14	79,45 \pm 0,19	84,42 \pm 0,07	80,93 \pm 0,13	80,57 \pm 0,11	85,28 \pm 0,40	79,02 \pm 0,35	79,94 \pm 0,25	78,22 \pm 0,27	80,47 \pm 0,14	75,91 \pm 0,28
PUFA	4,85 \pm 0,09	7,23 \pm 0,05	6,70 \pm 0,03	3,84 \pm 0,02	7,20 \pm 0,07	6,87 \pm 0,06	3,56 \pm 0,41	7,86 \pm 0,18	7,28 \pm 0,07	9,77 \pm 0,11	7,98 \pm 0,07	11,23 \pm 0,08

Em se tratando às diferentes frações dos ácidos gordos, verificou-se que há um maior conteúdo de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), seguido dos ácidos gordos saturados (SFA) e ácidos gordos poliinsaturados (PUFA). A cv. Manzanilla apresentou o maior valor para ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), 85,28%, e os menores teores para ácidos gordos saturados (SFA) e poli-insaturados (PUFA), sendo 11,67% e 3,56%, respetivamente. Os teores encontrados para as frações dos ácidos gordos e as razões MUFA/SFA e PUFA/SFA foram diferentes dos encontrados pelos autores López-López *et al.* (2015) ao analisarem os perfis de ácidos gordos das cvs. Hojiblanca e Manzanilla. Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) foram superiores neste estudo no que diz respeito ao azeite da cv. Manzanilla, e teores inferiores para ácidos gordos saturados (SFA) e poli-insaturados (PUFA) tanto em relação ao azeite da cv. Hojiblanca como aos azeites elementares das restantes cultivares. Uma relação de PUFA/SFA superior a 0,5 (Wood *et al.*, 2008) é recomendada para a prevenção de doenças coronárias por estarem associadas a ingestão excessiva de gordura saturada. Os valores médios encontrados neste trabalho estão, em suma, superiores ao limite recomendado, com exceção das cvs. Arbonosa, Cobrançosa, Cornicabra e Manzanilla, as quais apresentaram valores entre 0,31 a 0,47, que estão ligeiramente abaixo do limite recomendado.

4.1.2.2. *Composição em tocoferóis e tocotrienóis*

Os Tocoferóis são antioxidantes naturais presentes no azeite, sendo o alfa-tocoferol presente em quantidades superiores com relação a outros tocoferóis. No Quadro 6 estão apresentados os valores resultantes da determinação de tocoferóis para os azeites em estudo, sendo que nestes foram determinados o alfa-tocoferol, beta-tocoferol e gama-tocoferol.

As variações encontradas neste estudo podem estar relacionadas à fatores como colheita, clima e processamento, os quais influenciam significativamente na concentração de tocoferóis. A cv. Arbequina apresentou quantidades muito próximas entre as diferentes amostras com relação aos teores em alfa-tocoferol, estando estes variando entre 191,51 a 224,61 mg/kg. Entre as outras cultivares, os valores para alfa-tocoferol variaram entre 134,10, para a cv. Frantoio, a 249,65 mg/kg, para a cv. Cobrançosa. Ramos-Escudero *et al.* (2015) obtiveram teores destes constituintes para as

cvs. Arbequina, Cornicabra, Frantoio, Hojiblanca, Manzanilla, Picual e Picudo entre 187,90 e 286,80 mg/kg. Malheiro *et al.* (2013) encontraram um conteúdo de 254,2 mg/kg de Vitamina E total para a cv. Cobrançosa.

Quadro 6. Valores médios de tocoferóis e vitamina E total (mg/kg) dos azeites elementares (média \pm desvio padrão).

	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	Vitamina E Total
Arbequina 3*1,5	209,83 \pm 5,27	1,37 \pm 0,11	3,59 \pm 0,28	214,79 \pm 5,66
Arbequina 3,5*1,5	191,51 \pm 11,24	1,18 \pm 0,13	3,43 \pm 0,24	196,12 \pm 11,61
Arbequina 4*1	224,61 \pm 6,55	1,40 \pm 0,14	4,58 \pm 0,34	230,59 \pm 7,03
Arbequina 4*1,25	217,56 \pm 5,53	1,28 \pm 0,15	4,23 \pm 0,35	223,07 \pm 6,03
Arbequina 4*1,5	206,52 \pm 4,54	1,29 \pm 0,14	4,19 \pm 0,22	212,00 \pm 4,90
Arbequina 4*2	221,09 \pm 5,99	1,41 \pm 0,12	4,43 \pm 0,34	226,93 \pm 6,45
Arbosana	231,75 \pm 5,36	2,08 \pm 0,18	3,67 \pm 0,24	237,50 \pm 5,78
Arroniz	142,98 \pm 7,34	1,65 \pm 0,13	2,33 \pm 0,19	146,96 \pm 7,66
Cobrançosa	249,65 \pm 14,20	2,73 \pm 0,16	7,97 \pm 0,43	260,35 \pm 14,79
Cornicabra	213,06 \pm 0,19	1,77 \pm 0,13	4,65 \pm 0,18	219,48 \pm 0,50
Frantoio	134,10 \pm 7,20	1,20 \pm 0,08	3,28 \pm 0,07	138,58 \pm 7,35
Hojiblanca	174,48 \pm 12,98	2,16 \pm 0,05	4,42 \pm 0,09	181,06 \pm 13,12
Manzanilla	186,88 \pm 6,72	2,41 \pm 0,06	3,66 \pm 0,05	192,95 \pm 6,83
Picual	204,71 \pm 4,90	1,75 \pm 0,18	11,81 \pm 0,71	218,27 \pm 5,79
Picudo	203,44 \pm 11,70	2,45 \pm 0,13	6,06 \pm 0,19	211,95 \pm 12,02
Redondilla	161,48 \pm 7,96	1,39 \pm 0,15	2,30 \pm 0,06	165,17 \pm 8,17
Royuela	146,84 \pm 6,72	1,46 \pm 0,07	1,95 \pm 0,11	150,25 \pm 6,90
Zorzal ITA	225,23 \pm 21,91	2,27 \pm 0,21	4,25 \pm 0,36	231,75 \pm 22,48

4.1.2.3. *Composição em esteróis*

Os valores médios obtidos para o teor total de esteróis dos azeites elementares estão representados na Figura 7 para a cv. Arbequina (a) e as cultivares restantes (b), expressos em mg/kg.

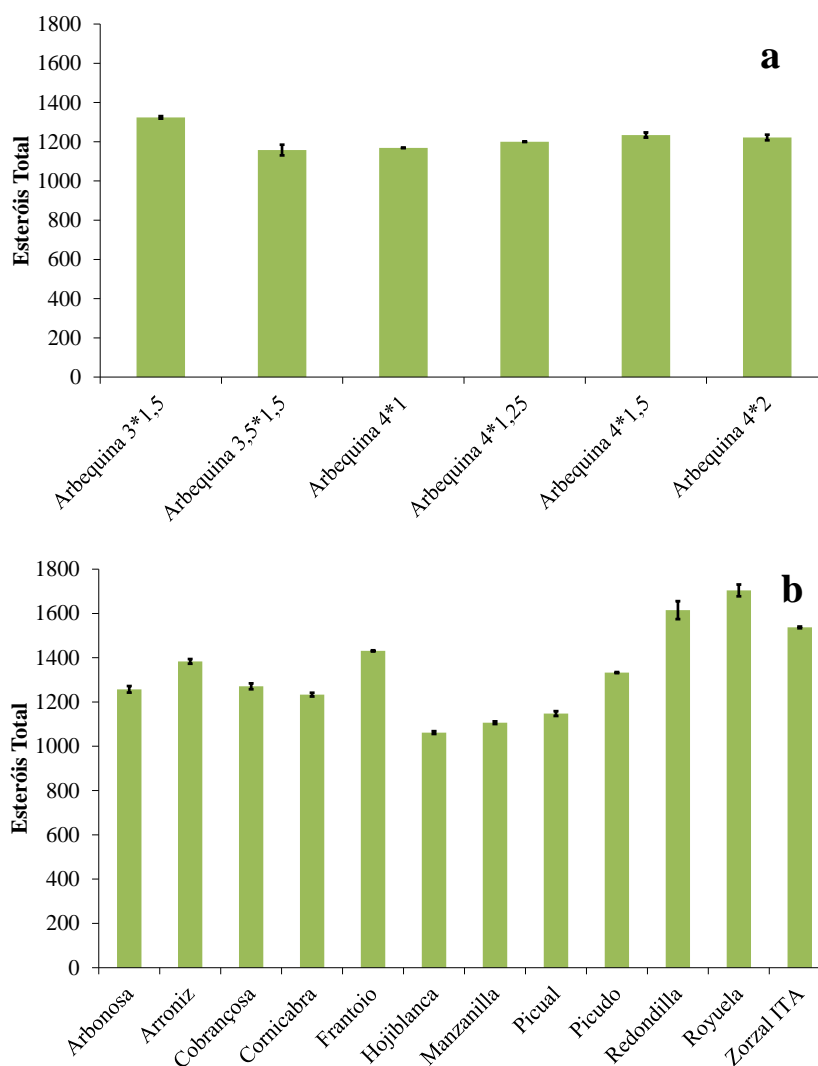


Figura 7. Valores médios de Esteróis Total com desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os azeites elementares das restantes cultivares (b) expressos em mg/kg.

Os valores médios obtidos para o teor total de esteróis (1106,18 a 1704,23 mg/kg) são superiores aos limites estabelecidos no Regulamento (CEE) nº 1348/13 para azeite virgem extra e azeite virgem, cujo teor mínimo não pode ser inferior a 1000mg/kg de azeite. O conteúdo de esteróis total foi assinalável entre as cvs. Royuela, sendo o maior valor equivalente a 1704,23 mg/kg, enquanto que a cv. Hojiblanca apresentou o menor valor, 1061,18 mg/kg. Os azeites produzidos a partir da cv. Arbequina apresentaram teores de esteróis entre 1157,67 a 1324,08 mg/kg. O perfil em esteróis dos azeites estudados encontra-se no Quadro 7.

Quadro 7. Valores médios e desvio padrão dos Esteróis Totais para os azeites elementares em percentagem.

	Colesterol	Campesterol	Campestanol	7-Campesterol	Estigmasterol	β -sitosterol aparente	Clerosterol	β -sitosterol	5-Avenasterol	5,24-Estigmasteradienol	Δ -7-Stigmasterol	7-Avenasterol
Arbequina 3*1,5	0,36 \pm 0,02	3,37 \pm 0,02	0,38 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,38 \pm 0,00	94,93 \pm 0,03	0,92 \pm 0,01	90,77 \pm 0,12	3,18 \pm 0,16	0,06 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Arbequina 3,5*1,5	0,33 \pm 0,01	3,12 \pm 0,01	0,37 \pm 0,02	0,07 \pm 0,00	0,37 \pm 0,02	95,25 \pm 0,05	1,21 \pm 0,07	93,28 \pm 0,06	0,69 \pm 0,05	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
Arbequina 4*1	0,32 \pm 0,01	3,66 \pm 0,02	0,47 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,47 \pm 0,1	94,53 \pm 0,00	0,92 \pm 0,04	91,40 \pm 0,06	2,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
Arbequina 4*1,25	0,31 \pm 0,00	3,44 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02	0,07 \pm 0,00	0,39 \pm 0,02	94,88 \pm 0,07	0,88 \pm 0,01	91,44 \pm 0,10	2,49 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
Arbequina 4*1,5	0,28 \pm 0,02	3,40 \pm 0,04	0,43 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,43 \pm 0,01	94,97 \pm 0,09	0,84 \pm 0,01	92,31 \pm 0,00	1,72 \pm 0,08	0,10 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Arbequina 4*2	0,28 \pm 0,00	3,57 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,38 \pm 0,01	94,95 \pm 0,03	0,88 \pm 0,00	90,30 \pm 0,07	3,73 \pm 0,10	0,04 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Arbonosa	0,25 \pm 0,01	3,90 \pm 0,03	0,48 \pm 0,03	0,08 \pm 0,00	0,48 \pm 0,03	94,54 \pm 0,00	0,89 \pm 0,03	90,40 \pm 0,11	3,23 \pm 0,08	0,03 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Arroniz	0,22 \pm 0,01	3,11 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,43 \pm 0,01	95,76 \pm 0,04	0,94 \pm 0,05	92,86 \pm 0,05	1,90 \pm 0,04	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Cobrançosa	0,24 \pm 0,00	2,96 \pm 0,00	0,50 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,50 \pm 0,01	95,84 \pm 0,01	0,97 \pm 0,01	93,37 \pm 0,03	1,42 \pm 0,03	0,08 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Cornicabra	0,18 \pm 0,01	3,62 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01	95,53 \pm 0,03	0,93 \pm 0,01	93,18 \pm 0,02	1,38 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Frantoio	0,20 \pm 0,00	3,20 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,39 \pm 0,01	95,58 \pm 0,02	0,84 \pm 0,00	93,21 \pm 0,04	1,33 \pm 0,06	0,19 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Hojiblanca	0,19 \pm 0,01	2,70 \pm 0,00	0,44 \pm 0,03	0,06 \pm 0,00	0,44 \pm 0,03	96,25 \pm 0,03	0,94 \pm 0,01	94,32 \pm 0,01	0,73 \pm 0,05	0,26 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Manzanilla	0,31 \pm 0,00	2,74 \pm 0,00	0,34 \pm 0,02	0,05 \pm 0,00	0,34 \pm 0,02	96,08 \pm 0,06	0,95 \pm 0,06	94,11 \pm 0,20	0,89 \pm 0,08	0,13 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Picual	0,21 \pm 0,00	3,26 \pm 0,02	0,52 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,52 \pm 0,01	95,54 \pm 0,03	0,96 \pm 0,03	93,23 \pm 0,01	1,30 \pm 0,06	0,05 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
Picudo	0,17 \pm 0,01	2,80 \pm 0,01	0,43 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00	96,21 \pm 0,00	0,93 \pm 0,00	94,58 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Redondilla	0,25 \pm 0,00	2,74 \pm 0,02	0,42 \pm 0,04	0,07 \pm 0,00	0,42 \pm 0,04	95,81 \pm 0,08	0,87 \pm 0,03	93,90 \pm 0,09	0,90 \pm 0,01	0,14 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Royuela	0,25 \pm 0,01	2,92 \pm 0,00	0,34 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,34 \pm 0,00	95,96 \pm 0,01	0,93 \pm 0,01	93,84 \pm 0,00	0,96 \pm 0,02	0,23 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00
Zorzal ITA	0,19 \pm 0,01	2,07 \pm 0,02	0,46 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,46 \pm 0,00	96,82 \pm 0,04	0,94 \pm 0,01	94,79 \pm 0,07	0,73 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00

Como era esperado, o β -sitosterol foi o esteroide mais abundante presente, variando o seu teor entre 94,53 a 95,25% para os azeites da cv. Arbequina e 94,54 a 96,82% para os azeites das restantes cultivares. De acordo com o Regulamento (CEE) n° 1348/13, para ser considerado azeite virgem extra e azeite virgem, o teor em β -sitosterol aparente deve ser superior a 93% do teor total de esteróis.

O Campesterol, o esteroide de segunda maior abundância nos azeites estudados, teve variação de teores entre 3,12 a 3,66% para os azeites da cv. Arbequina e 2,07 a 3,62% para os azeites das restantes cultivares, estando dentro do limite estabelecido pelo Regulamento (CEE) n° 1348/13, que sugere teores inferiores a 4%, para azeite virgem extra e azeite virgem.

López-Cortés *et al.* (2013) estudaram as cvs. Arbequina, Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla e Picual em relação ao conteúdo em esteróis. Os resultados deste estudo apontaram teores inferiores para o Estigmasterol nas mesmas cultivares, enquanto que para os valores de Campesterol foram próximos ou superiores nas mesmas cultivares. Os valores de β -sitosterol apresentaram diferenças superiores para as cvs. Manzanilla e Picual, e inferiores para as cvs. Arbequina, Cornicabra e Hojiblanca.

No que respeita aos álcoois triterpênicos eritrodiol e uvaol, os teores em azeite virgem extra e azeite virgem devem ser inferiores a 4,5%, o que se verificou na totalidade das amostras analisadas. De acordo com a Figura 8 (a), observa-se que a variação no conteúdo de eritrodiol + uvaol não foi assinalável dentre os azeites da cv. Arbequina. É notória a diferença do conteúdo de eritrodiol + uvaol nos azeites elementares das restantes cultivares, que permite concluir que o fator cultivar influencia na presença desses compostos. As cvs. Cornicabra e Picual apresentam teor de eritrodiol + uvaol até quatro vezes superior aos encontrados nas cvs. Frantoio e Manzanilla. Em estudo anterior, Casas *et al.* (2004) submeteram sete variedades a uma análise discriminante para a classificação das amostras em relação aos níveis de eritrodiol + uvaol presentes, discriminando todas as amostras assertivamente.

Na Figura 8 são apresentados os valores das médias com desvio padrão do conteúdo de Eritrodiol + Uvaol para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os azeites das demais cultivares (b).

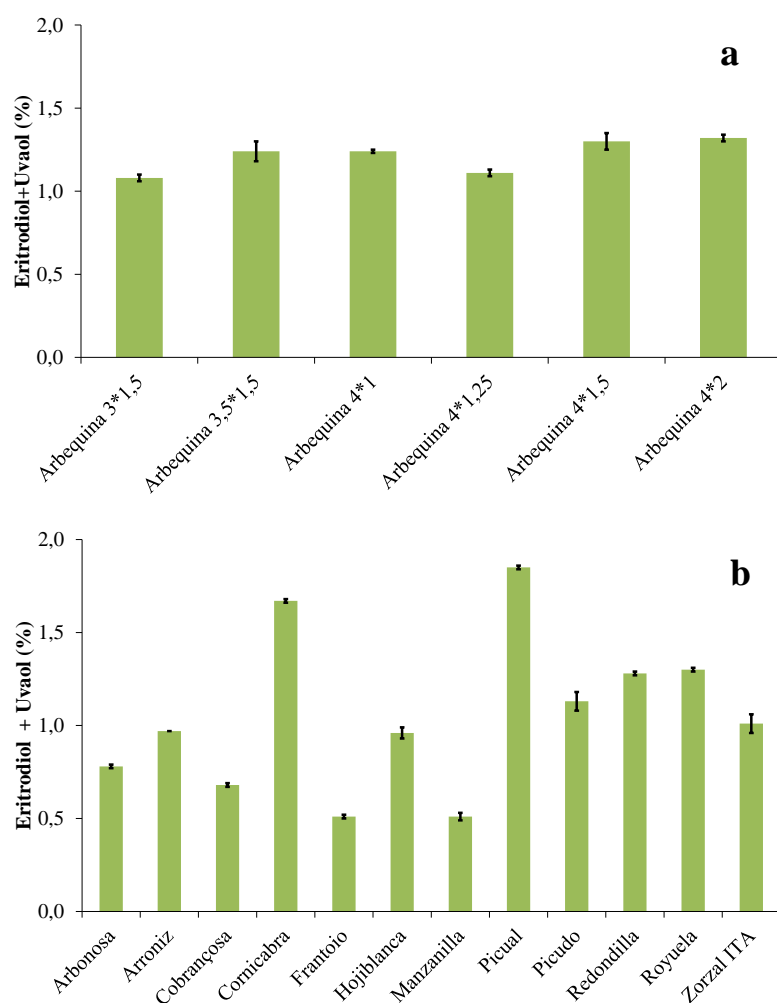


Figura 8. Valores médios de Eritrodio + Uvaol com desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os azeites elementares das restantes cultivares (b) em percentagem.

4.1.3. Atividade antioxidante

4.1.3.1. Teor em fenóis totais

Os fenóis totais dos azeites da cv. Arbequina (a) e dos azeites elementares das restantes cultivares (b) estão representados na Figura 9.

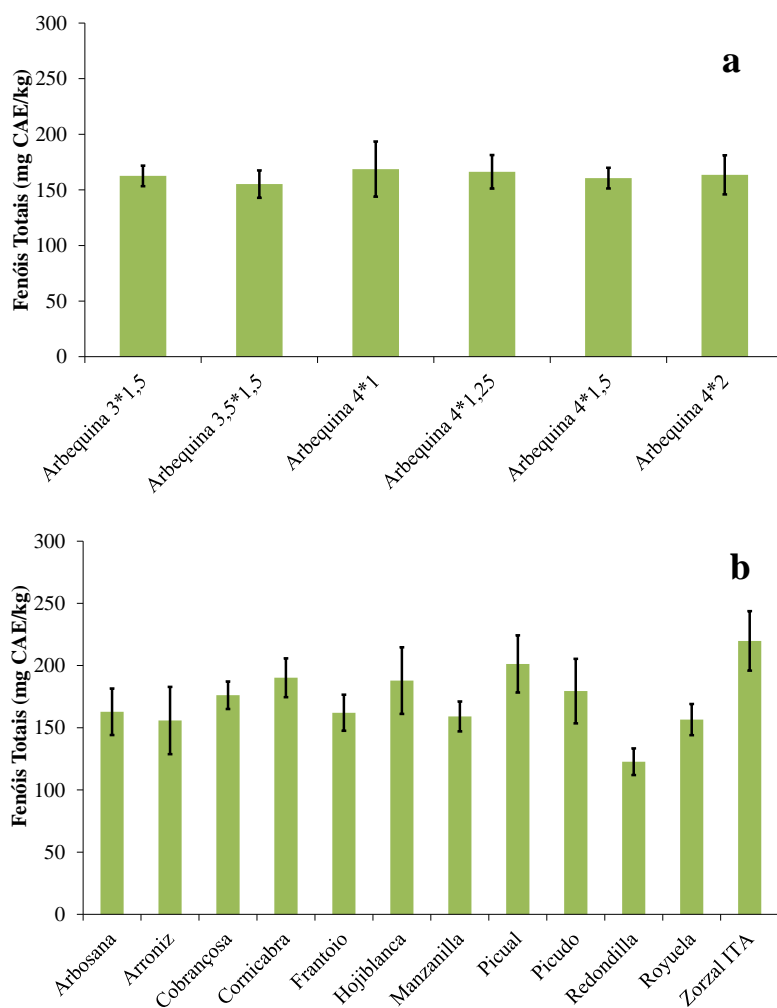


Figura 9. Valores médios de fenóis totais com desvio padrão dos azeites da cv. Arbequina (a) e dos azeites elementares das restantes cultivares (b).

A concentração mais elevada foi detetada na cv. Zorzal ITA ($219,80 \pm 23,90$ mg equivalentes de ácido cafeico/kg de azeite), enquanto que a menor concentração foi atribuída a cv. Redondilla ($122,67 \pm 10,71$ mg equivalentes de ácido cafeico/kg de azeite). A cv. Arbequina não apresentou variação significativa entre si por se tratar de um plantio de altas densidades. A variação nos teores de polifenóis encontrada neste estudo se deve a diversos fatores, tais como a variedade utilizada, o grau de maturação dos frutos, as condições edafoclimáticas, o manejo de campo e as condições de processamento, as quais, nas amostras analisadas neste estudo, possivelmente são muito variáveis face às diferentes cultivares de oliveira utilizadas.

4.1.3.2. Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é um parâmetro importante para a avaliação da qualidade dos óleos e gorduras, uma vez que fornece uma estimativa da susceptibilidade dos mesmos para a degeneração auto-oxidativa, que nos azeites virgens conduzem fundamentalmente à sua rancificação. A estabilidade oxidativa de um azeite é definida como o tempo necessário para o óleo começar a mostrar sinais de rancificação. Esta, por sua vez, depende das características próprias do azeite (insaturação, teor de antioxidantes, estado de oxidação, etc.) e varia segundo as condições de temperatura, luz, contato com o oxigénio, qualidade e tamanho dos recipientes, etc, a que esteja submetida a sua conservação. Os valores médios e desvio padrão para o tempo de indução expresso em horas são apresentados na Figura 10 para os azeites da cv. Arbequina (a) e para os demais azeites elementares das cultivares em análise (b).

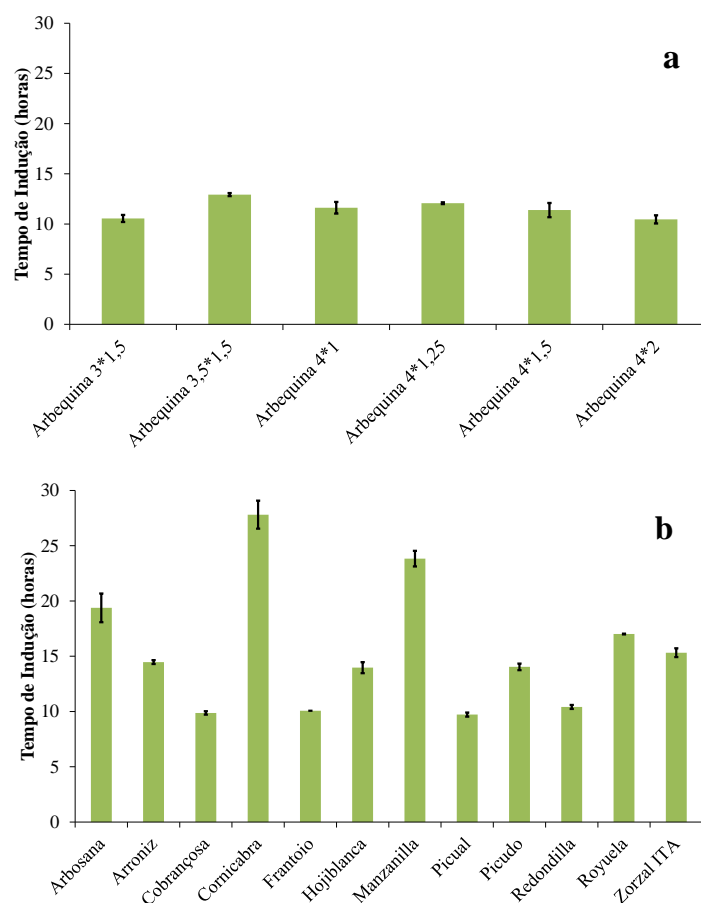


Figura 10. Valores médios de estabilidade oxidativa (horas) e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).

De acordo com a Figura 10 (b), percebe-se um comportamento muito variável entre os azeites elementares, sendo a cv. Cornicabra a de maior estabilidade apresentando tempo de indução superior as demais (27,81 h). Os azeites da cv. Arbequina não apresentaram grande variação entre si (10,46 a 12,93 h), mas evidenciou baixa estabilidade oxidativa quando comparada com o tempo de indução das cvs. Arbosana, Cornicabra, Manzanilla, e Royuella (19,38, 27,81, 23,83, 17,01 horas respetivamente). Os resultados obtidos para a estabilidade oxidativa das cvs. Arbequina, Cornicabra e Manzanilla foram superiores aos dos encontrados nos estudos realizados por Sena-Moreno *et al.* (2015). Essa variabilidade pode estar diretamente relacionada com o factor cultivar, com o índice de maturação e com a atividade antioxidante, uma vez que em baixos índices de maturação, o fruto não requer proteção oxidativa e, portanto, terá uma maior proteção contra a oxidação durante a exposição ao ar e a temperatura com relação a um fruto com alto índice de maturação.

4.1.3.3. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH^{*})

Um dos métodos para determinação da capacidade oxidante é medida pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}). Este método é uma das ferramentas mais utilizadas para se avaliar o potencial antioxidante, mais especificamente, a atividade antiradicalar dos azeites. A atividade sequestradora do radical de DPPH^{*} foi expressa em percentagem de inibição (Figura 11).

As cvs. Zorzal ITA e Cornicabra apresentaram uma percentagem de inibição assinalável com relação as outras cultivares, enquanto, as cvs. Arbequina e Frantoio tiveram percentagens entre 30 e 40% de inibição.

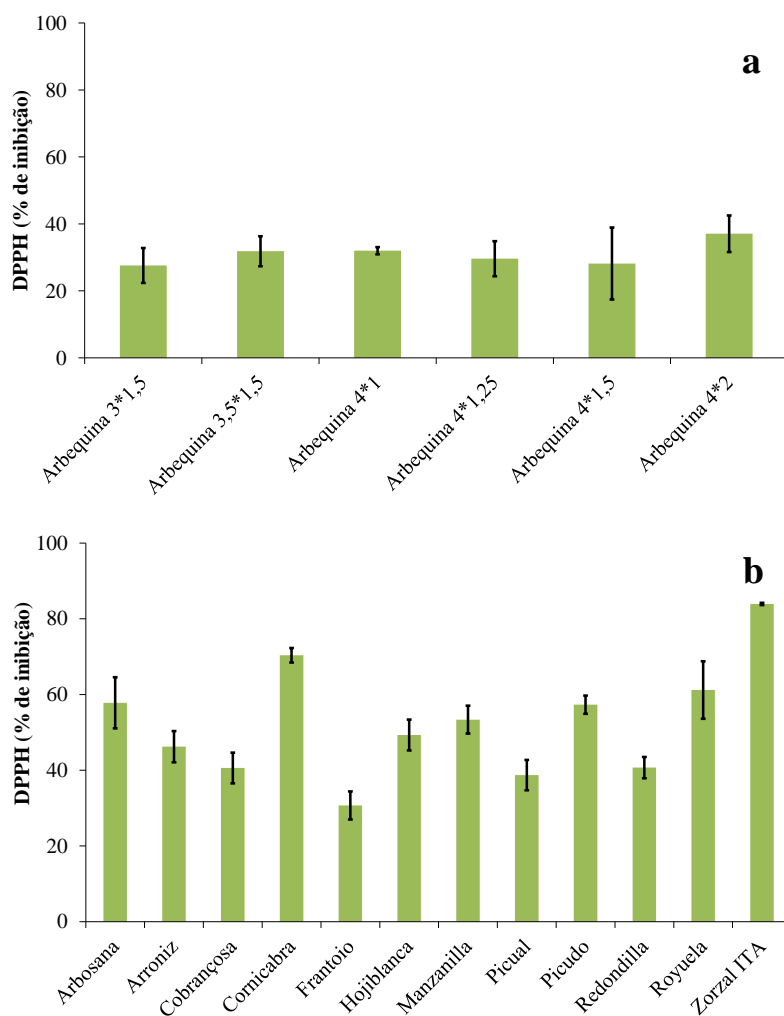


Figura 11. Valores médios da atividade sequestradora do radical DPPH do azeite e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).

4.1.3.4. *Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS^{•+})*

O método baseia-se na capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS (ABTS^{•+}). Assim, a atividade sequestradora do radical ABTS foi expressa em percentagem de inibição (Figura 12).

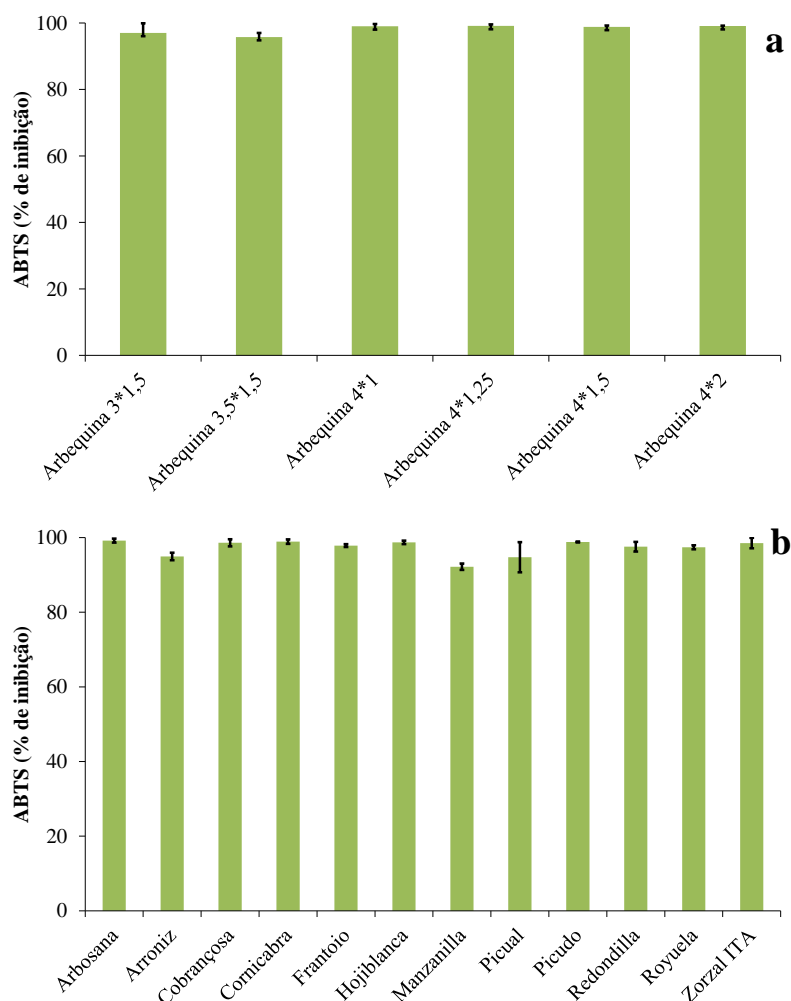


Figura 12. Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS do azeite e desvio padrão para os azeites da cv. Arbequina (a) e azeites elementares das restantes cultivares (b).

As percentagens de inibição das cultivares, de modo geral, foram consideradas elevadas, estando estas superiores a 90%.

4.1.4. Colorimetria

O azeite virgem possui cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo da variedade e do estado de maturação da azeitona (Moyano *et al.*, 2008). A cor do azeite é determinada pelos pigmentos existentes na sua composição, principalmente os pigmentos de clorofilas e carotenoides. A medição da cor, pelo método CIELAB, decorre sob a leitura dos parâmetros L^* , a^* e b^* , onde cada um distingue intervalos de cores primárias. Neste método, o parâmetro L^* mede a luminosidade e pode variar entre zero (preto) e cem (branco); o parâmetro a^* apresenta

o desvio da cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos), enquanto o parâmetro b^* apresenta o desvio da cor entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Silva *et al.*, 2007). De seguida, apresenta-se no Quadro 8 os valores médios e desvio padrão obtidos via CIELAB para os azeites elementares da medição da cor como para o índice de amarelecimento (YI).

Quadro 8. Valores médios de colorimetria (L^* , a^* , b^* , L , a e b) e de índice de amarelecimento (YI) dos azeites elementares (média e desvio padrão).

	CIELAB			L	Hunter		YI
	L^*	a^*	b^*		a	b	
Arbequina 3*1,5	69,85 ± 0,01	-14,41 ± 0,02	78,64 ± 0,00	63,67 ± 0,00	-12,52 ± 0,02	40,01 ± 0,01	160,82
Arbequina 3,5*1,5	65,25 ± 0,01	-15,26 ± 0,02	73,84 ± 0,02	58,62 ± 0,01	-12,84 ± 0,02	36,72 ± 0,01	161,67
Arbequina 4*1	68,20 ± 0,00	-13,70 ± 0,01	77,98 ± 0,01	61,84 ± 0,00	-11,80 ± 0,00	39,02 ± 0,00	163,34
Arbequina 4*1,25	68,39 ± 0,01	-13,87 ± 0,02	78,25 ± 0,02	62,05 ± 0,01	-11,95 ± 0,01	39,17 ± 0,01	163,47
Arbequina 4*1,5	64,74 ± 0,01	-15,13 ± 0,01	73,41 ± 0,02	58,07 ± 0,01	-12,69 ± 0,01	36,38 ± 0,01	162,01
Arbequina 4*2	65,30 ± 0,00	-14,72 ± 0,01	74,65 ± 0,02	58,67 ± 0,00	-12,41 ± 0,01	36,90 ± 0,01	163,31
Arbosana	72,24 ± 0,01	-13,26 ± 0,02	75,38 ± 0,01	66,35 ± 0,01	-11,73 ± 0,02	40,51 ± 0,01	149,04
Arroniz	65,05 ± 0,01	-12,20 ± 0,01	73,40 ± 0,02	58,41 ± 0,00	-10,35 ± 0,01	36,54 ± 0,00	161,19
Cobrançosa	62,59 ± 0,00	-14,31 ± 0,01	68,86 ± 0,02	55,77 ± 0,01	-11,85 ± 0,01	34,42 ± 0,00	157,17
Cornicabra	55,61 ± 0,00	-16,59 ± 0,01	59,42 ± 0,02	48,50 ± 0,01	-12,96 ± 0,01	29,23 ± 0,01	152,65
Frantoio	68,65 ± 0,00	-15,47 ± 0,01	78,04 ± 0,03	62,34 ± 0,01	-13,30 ± 0,01	39,27 ± 0,01	162,40
Hojiblanca	66,82 ± 0,01	-14,80 ± 0,01	75,86 ± 0,01	60,32 ± 0,01	-12,59 ± 0,01	37,90 ± 0,01	162,19
Manzanilla	60,00 ± 0,00	-13,44 ± 0,01	66,56 ± 0,01	53,03 ± 0,00	-10,96 ± 0,01	32,72 ± 0,00	158,48
Picual	57,58 ± 0,02	-8,70 ± 0,08	28,98 ± 0,27	50,52 ± 0,02	-7,07 ± 0,06	19,14 ± 0,14	71,90
Picudo	64,48 ± 0,02	-14,85 ± 0,01	73,30 ± 0,02	57,79 ± 0,03	-12,45 ± 0,01	36,23 ± 0,02	162,38
Redondilla	69,04 ± 0,01	-12,65 ± 0,02	74,40 ± 0,02	62,77 ± 0,01	-10,98 ± 0,02	38,71 ± 0,01	153,96
Royuela	65,73 ± 0,01	-11,34 ± 0,04	73,32 ± 0,02	59,14 ± 0,01	-9,68 ± 0,03	36,85 ± 0,01	159,36
Zorzal ITA	63,25 ± 0,06	-13,36 ± 0,06	59,51 ± 0,47	56,46 ± 0,07	-11,15 ± 0,05	32,44 ± 0,16	134,42

Em termos de luminosidade (L^*), verifica-se que as cultivares se apresentaram intermediárias. As cvs. Picual e Arbosana apresentaram a menor e maior média para a luminosidade, 57,58 e 72,24 respetivamente. Para a tonalidade esverdeada (a^*), verifica-se que ambas cultivares apresentam valores abaixo de zero e a irem de encontro com a tonalidade característica dos azeites, derivado dos pigmentos de clorofila. Para o parâmetro b^* , todas as amostras apresentam uma tonalidade amarelada, podendo ter várias origens desde o reduzido teor em pigmentos, ou mesmo um avançado estado de maturação. O índice de amarelecimento foi similar entre algumas das amostras, podendo destacar as cvs. Picual e Frantoio que apresentaram a menor e maior média, 71,90 e 162,40 respetivamente. Os valores para o parâmetro de luminosidade (L^*) juntamente ao de índice de amarelecimento (YI) podem vir a sugerir que os azeites elementares possuem em sua composição um maior teor de feofitinas que em clorofilas. Algumas reações no azeite podem vir a degradar a clorofila, pigmento verde, formando assim as feofitinas, pigmento amarelado (Criado *et al.*, 2008).

4.2. EFEITO DO AQUECIMENTO EM MICRO-ONDAS EM AZEITE VIRGEM COM E SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*

Com o objetivo de avaliar o efeito protetor da adição de extrato da microalga *Scenedesmus almeriensis* sobre azeite sujeito a aquecimento em micro-ondas, foram preparados diferentes seis amostras de azeite, provenientes do mesmo lote, onde em três delas foi adicionado extrato de alga enquanto tal não se verificou nas restantes. As amostras assim preparadas foram sujeitas a aquecimento em micro-ondas, à potência máxima, durante cinco minutos, sendo avaliado o efeito da adição de alga em alguns parâmetros de qualidade, composição química e atividade antioxidante.

4.2.1. Parâmetros de qualidade

Nos azeites inicial (T_0) e após ter sido sujeito a aquecimento em micro-ondas, com (T_{5EXT}) e sem (T_5) adição de algas, foi avaliada a acidez, índice de peróxido e espectrofotometria no ultravioleta. No Quadro 11, são apresentados os valores médios e respetivo desvio padrão para os azeites avaliados.

Quadro 9. Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez total (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O₂/kg); K₂₃₂; K₂₇₀ e ΔK] dos azeites controlo sem aquecimento (T₀), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T₅).

	Acidez	Índice de Peróxido (mEqO ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
T ₀	0,1 ± 0,0	4,57 ± 0,59	1,36 ± 0,10	0,18 ± 0,02	0,00 ± 0,00
T _{5EXT}	0,2 ± 0,0	9,58 ± 1,15	2,62 ± 0,59	0,31 ± 0,06	0,00 ± 0,00
T ₅	0,2 ± 0,0	10,25 ± 0,42	1,81 ± 0,24	0,17 ± 0,03	0,00 ± 0,00

No presente trabalho verificou-se um aumento de 100% nos valores de acidez registados em azeites sujeitos a aquecimento (0,2%) quando comparados com o controlo (0,1%). Contudo, uma vez que se tratam de azeites com um valor de acidez muito baixo, tal pode não corresponder a um aumento real deste valor, visto que a passagem de 0,1% para 0,2% de acidez, muitas vezes tem a ver com a queda de mais uma gota ou menos de titulante, fazendo alterar este valor. A adição de extrato de algas por si só parece não exercer qualquer influência neste parâmetro. Limón *et al.* (2015), ao estudarem o efeito de duas concentrações de extrato de algas verificaram que não foi significativa a alteração neste parâmetro. Assim, o aumento da acidez pode ser atribuído à existência de alguma falta de exatidão experimental, ou ao aquecimento em micro-ondas. Malheiro *et al.* (2009), correlacionaram os valores de acidez, em azeites, com o tempo de aquecimento e verificaram que não ocorreram alterações com significado estatístico.

No que respeita ao índice de peróxido, os valores obtidos são claramente influenciados pelo aquecimento em micro-ondas. Em ambas as situações avaliadas, ou seja, azeite com e sem adição de extrato de algas, o valor do índice de peróxidos aumentou mais de 100%, sendo esse aumento ainda mais pronunciado no caso em que não foi adicionado extrato. É visível que o azeite sujeito a aquecimento com adição de extrato de alga sofreu uma menor oxidação, que pode estar relacionado com o maior teor em antioxidantes nesses azeites. As alterações observadas estarão sobretudo relacionadas com o aquecimento em micro-ondas (Malheiro *et al.*, 2009), visto a adição de extratos de algas em azeites não sujeitos a este processamento alimentar parece ter um efeito positivo neste parâmetro, reduzindo o seu valor (Limón *et al.*, 2015).

O coeficiente de extinção K₂₃₂, que está relacionado à presença de produtos de oxidação primária, sofreu variação quase duas vezes superior para o azeite sujeito a aquecimento com alga (1,36 para 2,62). Este aumento está relacionado com a presença

de pigmentos da alga, uma vez que a intensidade da cor é proporcional ao valor do coeficiente de extinção pelo espectrofotômetro. A mesma situação é vista para o coeficiente de extinção K_{270} , o azeite sujeito a aquecimento com adição de alga foi mais elevado. O azeite sujeito a aquecimento sem adição de alga obteve uma menor média que para o azeite controlo.

Para se medir a influência dos efeitos de aquecimento e adição de algas, fez-se a aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA) aos parâmetros de qualidade dos azeites. Neste caso, as amostras foram distribuídas de forma que 1 e 2 se referem ao controlo, de 3 a 8 as amostras aquecidas sem adição de extratos de algas enquanto que de 9 até 14 se referem aquelas amostras aquecidas com adição de extratos de algas. Os resultados mostraram uma discriminação entre o azeite controlo das amostras aquecidas em micro-ondas. Além disso, observando-se a segunda componente principal (PC 2), as amostras em que se adicionaram extrato de algas aparecem discriminadas daquelas aquecidas sem a presença do extrato, como pode ser visto na Figura 13. A aplicação de PCA para este fim utilizou 2 componentes para explicar 96,87% da variância total dos dados. Neste caso, a PC 1 (eixo “x”) explica 48,30% da variância total, enquanto que o segundo eixo explica 32,34%.

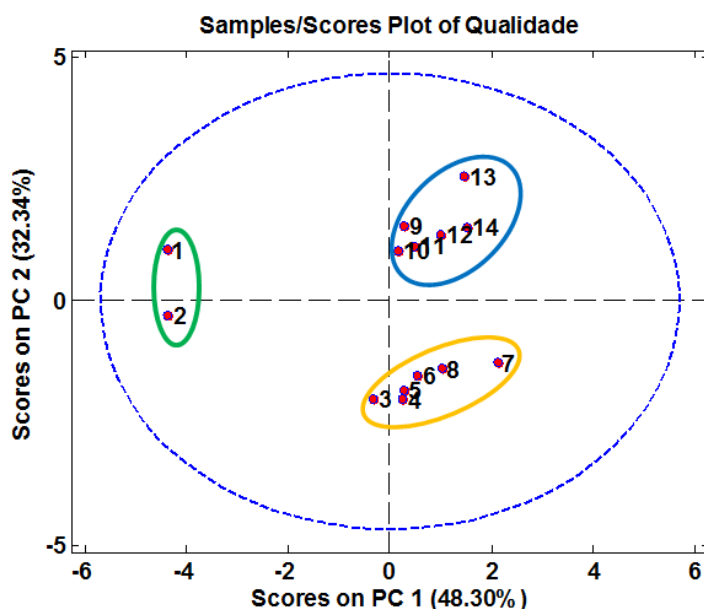


Figura 13. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas, com relação aos parâmetros de qualidade e atividade antioxidante.

Para se entender quais parâmetros foram responsáveis por tal discriminação, é necessário observar-se o gráfico apresentado na Figura 14, o qual se refere aos “loadings” (pesos) das componentes principais (PCs) utilizadas (neste caso, PC 1 e PC 2). A Figura 14 a apresenta os loadings para PC 1 enquanto que a Figura 14 b os loadings para PC 2. As variáveis utilizadas foram (1) acidez total (% ácido oleico), (2) índice de peróxido (mEq.O₂/Kg), (3) K₂₃₂, (4) K₂₇₀, (5) ΔK, (6) Rancimat, (7) ABTS e (8) DPPH. Para entender esta análise é necessário que consideremos os eixos separadamente, de forma a perceber que a PC 1 apresenta valores positivos e negativos, tal qual em PC 2. Assim, observando-se a Figura 14, nota-se que os fatores implicantes na separação das amostras T₀ (controlo) das T₅ (aquecidas sem algas) e T_{5EXT} (aquecidas com adição de algas), são (1) acidez total (% ácido oleico), (2) índice de peróxido, (3) K₂₃₂, (4) K₂₇₀, (5) ΔK e (7) ABTS. Em outras palavras, como as amostras que se referem ao controlo se apresentam com valores de scores negativos em PC 1, podemos inferir que estas são mais influenciadas por (6) Rancimat e (8) DPPH, sugerindo, portanto, que o que as diferencia são fatores oxidativos. Assim, podemos sugerir que as amostras controlo se encontram menos oxidadas que aquelas aquecidas. Por outro lado, as amostras aquecidas sem a presença de algas se apresentam com valores mais significativos para (1) acidez total (% ácido oleico), (2) índice de peróxido e valores para (7) ABTS. Portanto, as amostras T_{5EXT} (de 9 a 14) se apresentam com valores mais significativos para (3) K₂₃₂, (4) K₂₇₀, (5) ΔK, (6) Rancimat e (8) DPPH. Como estas apresentam elevados valores para DPPH, sugere-se que estas apresentem maior atividade antioxidante quando comparadas com as T₅, aquecidas sem a adição de algas. Tais resultados parecem condizentes com o que se espera ao adicionar tais substâncias aos azeites, uma vez que se espera que tais algas possam produzir um efeito protetor nos azeites por existir a possibilidade de que estas, de alguma forma, possam liberar antioxidantes para o meio.

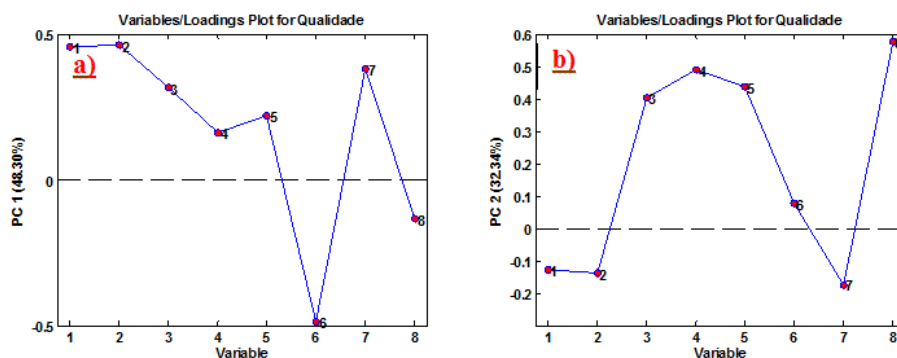


Figura 14. a) Loadings de PC 1 e b) Loadings de PC 2, relacionados com as diferentes variáveis avaliadas.

4.2.2. Composição química

4.2.2.1. Composição em ácidos gordos

O perfil em ácidos gordos dos azeites controlo e sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) é apresentado no Quadro 10.

Quadro 10. Valores médios do perfil em ácidos gordos dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) (média e desvio padrão em percentagens).

	T_0	T_{5EXT}	T_5
C16:0	10,11 ± 0,70	11,03 ± 0,17	10,79 ± 0,93
C16:1	0,60 ± 0,02	0,63 ± 0,01	0,64 ± 0,03
C17:0	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02
C17:1	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,01
C18:0	2,07 ± 0,04	2,06 ± 0,02	2,07 ± 0,07
C18:1	78,04 ± 0,75	77,65 ± 0,16	77,98 ± 0,71
C18:2	6,80 ± 0,05	6,55 ± 0,05	6,45 ± 0,34
C18:3	0,61 ± 0,01	0,72 ± 0,13	0,65 ± 0,01
C20:0	0,53 ± 0,01	0,31 ± 0,14	0,35 ± 0,01
C20:1n9	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,03
C22:0	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
C24:0	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
SFA	13,15 ± 0,72	13,77 ± 0,24	13,61 ± 0,95
MUFA	79,89 ± 0,75	78,91 ± 0,13	79,24 ± 0,70
PUFA	7,40 ± 0,05	7,27 ± 0,15	7,11 ± 0,32

As diferenças entre os resultados obtidos não são muito perceptíveis, apresentando valores similares entre o azeite controle sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) adição de extrato de alga. O ácido palmítico (C16:0) sofreu um aumento no azeite sujeito a aquecimento com alga (10,11 para 11,03). Os ácidos oleico, linoleico e linolénico, sofreram uma pequena redução com o aquecimento. Para o ácido oleico (C18:1), o azeite aquecido com extrato de alga sofreu uma maior redução em relação ao azeite controle sem aquecimento (78,04 para 77,65). A razão MUFA/SFA e PUFA/SFA também sofreram redução, sendo a relação PUFA/SFA muito similar entre os azeites estudados sob diferentes condições.

Afim de se notar as diferenças existentes com relação a composição em ácidos gordos, fez-se a Análise de Componentes Principais. A matriz avaliada por PCA foi composta de forma que as amostras de 1 a 4 se referem ao controle (T_0), de 5 a 10 se referem a amostra sem adição de algas (T_5) e de 11 a 16 as amostras que sofreram a adição de algas (T_{5EXT}). Neste caso, a aplicação de PCA permitiu a separação dos diferentes efeitos, ou seja, T_0 , das amostras T_5 e T_{5EXT} . Para este tratamento, a PCA utilizou 6 componentes para explicar 98,52% da variância total dos dados, sendo que a melhor visualização foi possibilitada através da plotagem entre PC 1 e PC 5. Os resultados estão apresentados na Figura 15, a qual evidencia a discriminação das amostras com e sem aquecimento das amostras controle, já que estas últimas são as únicas dispostas em valores positivos de PC 5, que explica 8,45% da variância total dos dados. No entanto, para este caso não foi possível separar com clareza as amostras T_5 das T_{5EXT} , pois para que esta separação seja perceptível, seria necessário um gráfico destes resultados que possibilitasse a visualização em 3 dimensões.

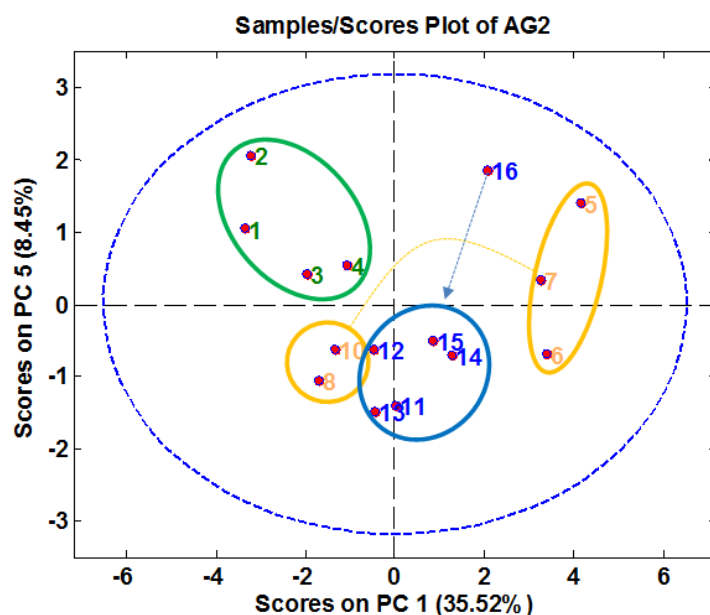


Figura 15. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas, com relação aos ácidos gordos.

Para entender as separações, observou-se o gráfico da Figura 16, que traz informações sobre os loadings utilizados. Assim, pode-se inferir que as amostras controle se diferenciaram das demais amostras por apresentarem, principalmente, teores superiores de C17:0 (variável 3) e C24:0 (variável 12).

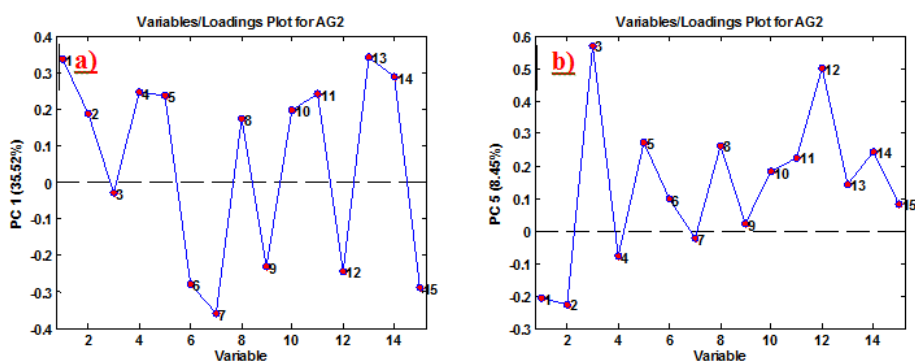


Figura 16. a) Loadings de PC1 e b) Loadings de PC5, relacionados com as diferentes variáveis avaliadas.

4.2.2.2. *Composição em tocoferóis e tocotrienóis*

A composição em tocoferóis dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_5) e sem adição de alga (T_{5EXT}) detalhada está relatado no Quadro 11.

Quadro 11. Valores médios de tocoferóis e vitamina E total (mg/kg) dos azeites controlo sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) (média e desvio padrão).

	α -Tocoferol	β -Tocoferol	λ -Tocoferol	Vitamina E Total
T_0	191,51 \pm 11,24	1,18 \pm 0,13	3,43 \pm 0,24	196,12 \pm 11,61
T_{5EXT}	132,73 \pm 5,03	1,28 \pm 0,12	2,73 \pm 0,08	136,72 \pm 5,10
T_5	134,62 \pm 9,03	1,10 \pm 0,09	2,42 \pm 0,13	138,10 \pm 9,25

Foram detectados e quantificados três tocoferóis nos azeites: alfa- tocoferol, beta-tocoferol e gama-tocoferol. Os azeites sujeitos a aquecimento apresentaram valores inferiores para alfa-tocoferol, gama-tocoferol e vitamina E em relação ao azeite controlo (T_0). Assim como Malheiro *et al.* (2015) verificaram que a adição de alga ao azeite não afeta consideravelmente a quantidade total de tocoferóis bem como tocoferóis individuais, os resultados obtidos em azeites sujeitos a aquecimento com adição de alga não apresentaram diferença assinalável na preservação da composição antioxidante. O aquecimento do azeite em micro-ondas contribui para perdas significantes na composição dos azeites, como o parâmetro de alfa-tocoferol que sofre uma diminuição proporcional ao tempo de aquecimento que é submetido verificado por Malheiro *et al.* (2009).

A aplicação da Análise de Componentes Principais ao perfil de composição em tocoferóis possibilitou a separação entre todas as amostras, como pode ser observado na Figura 17. Observa-se que a PC 1, que explica 64,30% da variância dos dados, separou as amostras controlo (de 1 até 4) nos valores positivos de PC 1, das amostras aquecidas (amostras de 5 até 16). Já para a PC 3, que explica 3,60% da variância, ao considerar-se apenas as amostras aquecidas, foi possível observar a separação das amostras sem adição de algas (T_5 : de 5 até 10) daquelas que tiveram adição do extrato de algas (T_{5EXT} : de 11 até 16).

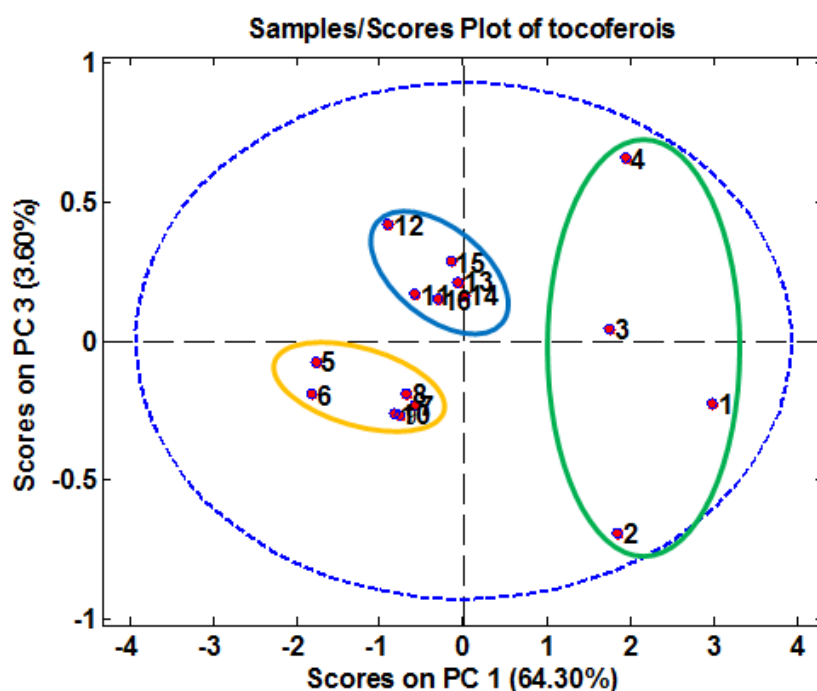


Figura 17. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras avaliadas quanto ao teor de diferentes tocoferóis.

Para entender quais compostos diferenciaram uma amostra da outra, observou-se o gráfico dos loadings de PC 1 e de PC 3, apresentados nas Figura 18 a) e b), respectivamente. Considerando que as variáveis avaliadas foram os teores de (1) α -Tocoferol, (2) β -Tocoferol e (3) γ -Tocoferol, nota-se que as amostras controle se apresentaram como mais ricas, de maneira geral, em tocoferóis. Esta observação já era esperada, uma vez que o aquecimento leva a degradação de tocoferóis, o que pode diferenciar as amostras avaliadas. No caso das amostras aquecidas, aquelas que não continham alga se diferenciaram das T_{5EXT} por apresentarem maior quantidade relativa de α -Tocoferol (variável 1), enquanto que as T_{5EXT} apresentaram maior teor relativo de γ -Tocoferol (variável 3). Este efeito sugere que ou as algas suprimem os α -Tocoferóis ou causam algum efeito que mascara a presença destes compostos. No entanto, não é possível afirmar, a partir deste estudo, qual foi a causa deste efeito.

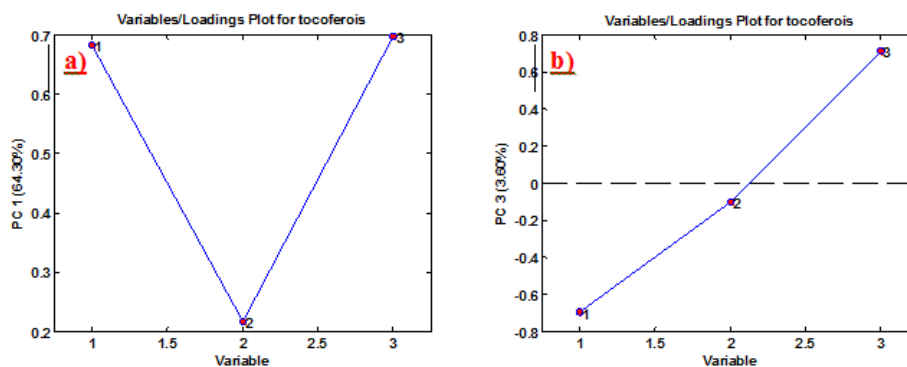


Figura 18. a) Loadings de PC1 e b) Loadings de PC5, relacionados com as variáveis (1) α -Tocoferol, (2) β -Tocoferol e (3) γ -Tocoferol.

4.2.2.3. *Composição em pigmentos*

Os pigmentos encontrados nos azeites analisados foram os carotenoides e feofitinas que estão apresentados no Quadro 12.

Quadro 12. Valores médios da determinação de pigmentos nos azeites sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) expressos em mg/kg.

	Carotenoides (mg/kg)	Feofitina (mg/kg)
T_{5EXT}	26,81 \pm 1,34	8,66 \pm 0,46
T_5	12,81 \pm 0,56	9,92 \pm 0,56

As feofitinas são os derivados das clorofilas formadas pelo meio ácido durante o processo de extração do azeite virgem. O aumento deste composto durante armazenamento do azeite é provavelmente resultado de um processo não enzimático, envolvendo a formação e subsequente acumulação de radicais livres, que são os principais responsáveis pela destruição de pigmentos (Criado *et al.*, 2008). O aquecimento aumenta a propensão da degradação dos pigmentos e outros compostos antioxidantes (Malheiro *et al.*, 2009; Luaces *et al.*, 2005), o que é verificado pelos resultados obtidos para o azeite com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5).

Os resultados para os teores de pigmentos dos carotenoides do azeite com adição de alga foram superiores, assim como verificado por Limón *et al.* (2015). Para além dessa condição, a alga atua como protetor antioxidante quando o azeite é sujeito a aquecimento evitando a degradação destes compostos.

4.2.3. Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos azeites controle sem aquecimento (T_0), sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem adição de alga (T_5) foram feitas a partir das análises da estabilidade oxidativa, atividade sequestradora dos radicais livres DPPH e ABTS.

A variação do tempo de indução foi assinalável nos azeites sujeitos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) a adição de alga, verificando-se uma redução de 12,93 h (T_0) para 9,65 e 9,53 h, T_{5EXT} e T_5 respectivamente. Limón *et al* (2015) verificaram que a adição de alga em azeites, não sujeitos a aquecimento, aumenta o tempo de indução. Portanto, pode-se dizer que ao sujeitar o azeite ao aquecimento, a atividade antioxidante do azeite com e sem adição de alga reduz ao mínimo o que explica o baixo tempo de indução.

Os resultados das atividades sequestrantes do radical livre DPPH e ABTS apresentaram valores positivos para o azeite aquecido adicionado de extrato de alga. Este apresentou um maior potencial antioxidante mesmo nas condições de aquecimento, mantendo preservado as suas propriedades pela ação antioxidante protetora da alga (Ismail e Hong, 2002).

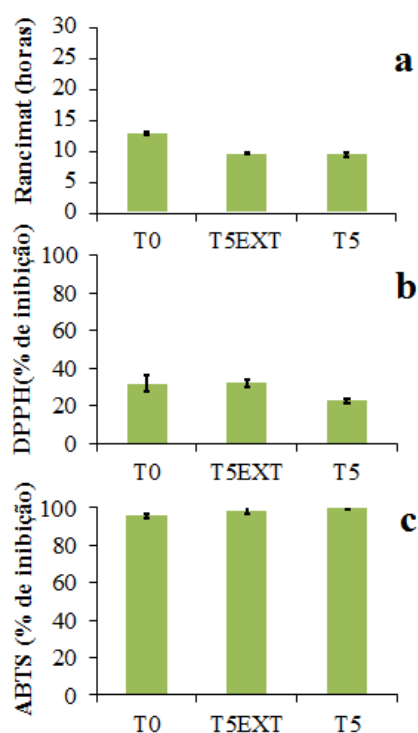


Figura 19. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de estabilidade oxidativa (horas) (a), atividade sequestrante do radical livre DPPH (percentagem de inibição) (b) e atividade sequestrante do radical livre ABTS (percentagem de inibição) (c) para os azeites controlo sem aquecimento (T₀), sujeito a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T₅) adição de extrato de alga.

4.2.4. Colorimetria

No Quadro 14 encontra-se a apresentação dos valores médios e desvio padrão obtidos da medição de cor pelo método CIELAB, e também as médias obtidas do cálculo para a diferença de cor (ΔE) e índice de amarelecimento (YI), nos azeites com adição de algas sujeitos a aquecimento em micro-ondas.

Os resultados apresentados na tabela foram também utilizados para a análise de componentes principais na tentativa de se observar alguma similaridade ou diferença entre as amostras ao se avaliarem todas as variáveis ao mesmo tempo.

Quadro 13. Valores médios de colorimetria (L^* , a^* , b^* , L , a e b) e respetivos desvio padrão.

	CIELAB			HUNTER			ΔE	YI
	L^*	a^*	b^*	L	a	b		
T ₀	65,25 ± 0,01	-15,26 ± 0,02	73,84 ± 0,02	58,62 ± 0,01	-12,84 ± 0,02	36,72 ± 0,01	-	161,67
T _{5EXT}	62,52 ± 2,87	-0,19 ± 0,42	72,56 ± 5,30	55,71 ± 3,04	-0,17 ± 0,36	35,12 ± 2,42	15,37	165,80
T ₅	67,10 ± 7,10	-11,31 ± 1,86	71,13 ± 14,20	60,79 ± 7,72	-9,79 ± 1,95	37,00 ± 6,77	5,14	151,44

A diferença de luminosidade encontrada nos azeites com e sem adição de alga é justificada pelo aquecimento que degradam os pigmentos, nomeadamente clorofila e carotenoides, que são termoláveis como visto pelos autores Malheiro *et al.* (2009) que detetaram este efeito ao submeterem azeites de regiões diferentes a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas. O impacto da presença da alga no azeite é claramente percebido na média do parâmetro a^* , que vai do verde (-120) ao vermelho (120). As médias para a^* quando adicionado de alga foi mais próximo à zero (-0,19), o que sugere a mudança da coloração esverdeada típico de azeites para uma coloração alaranjada, característica dos carotenoides. Na Figura 20 está uma apresentação da diferença de cor a olho nu dos azeites controlo (T_0) sem aquecimento, sujeito a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) extrato de alga.

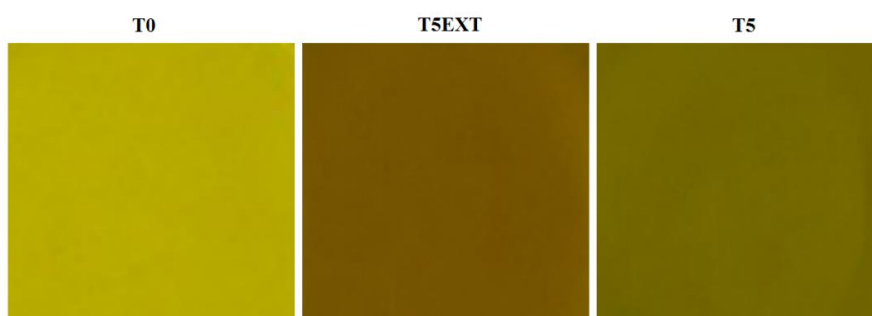


Figura 20. Diferença de cor dos azeites submetidos a aquecimento com (T_{5EXT}) e sem (T_5) adição de extrato de alga.

Em geral, os resultados obtidos para L^* , a^* e b^* mostram que a adição de alga ao azeite trouxe mudanças assinaláveis que é confirmado pelo parâmetro ΔE (diferença de cor em relação ao controlo) e índice de amarelecimento (YI), ambos superiores para o azeite sujeito a aquecimento adicionado de alga. A diferença de cor da amostra controlo para a amostra sujeita a aquecimento com adição de alga (T_{5EXT}) chega a ser três vezes maior quando comparado a amostra sujeita a aquecimento sem adição de alga (T_5), que pode ser explicada pela presença de carotenoides na composição da alga *S. almeriensis*.

Para a análise de componentes principais, consideraram-se as variáveis produzidas pelo método CIELAB (L^* , a^* e b^*), HUNTER (L , a e b) e o índice de amarelecimento (YI). Para esta análise, a utilização de 3 PCs pode explicar 99,99% da variância total dos dados. Considerando-se que a amostra T_0 (controlo) foi medida apenas uma vez,

enquanto que a T_5 e T_{5EXT} foram medidas em triplicata, temos que a amostra 1 corresponde a T_0 , as amostras de 2 até 4 correspondem a T_5 e as amostras de 5 até 7 correspondem a T_{5EXT} , é possível observar a partir do gráfico da Figura 21 a separação das amostras de acordo com suas características. Observou-se em valores positivos de PC 2 e PC 3, simultaneamente, apenas as amostras T_{5EXT} , enquanto que os valores positivos de PC 3 e negativos de PC 2 destacam a amostra T_0 , sendo as T_5 destacadas para os valores negativos de PC 2 e PC 3, simultaneamente,

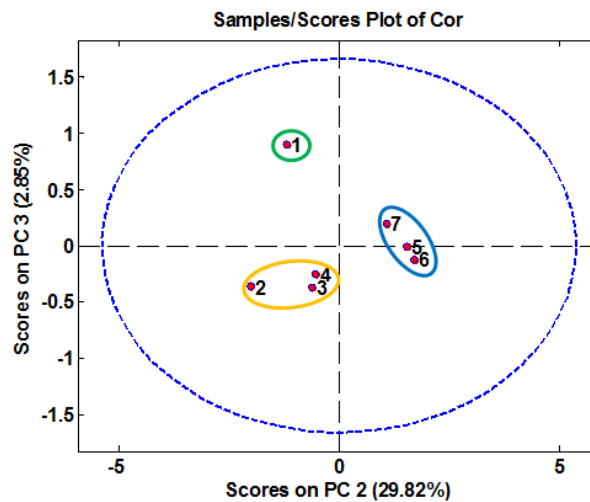


Figura 21. Análise de componentes principais aplicada às diferentes amostras adas quanto, quanto a parâmetros de cor.

Para melhor entender quais as diferenças, os parâmetros avaliados foram CIELAB L^* (1), a^* (2), b^* (3), Hunter L (4), a (5), b (6) e YI (7). Neste caso, observou-se que as amostras T_{5EXT} se diferenciaram por CIELAB a^* (2), b^* (3), Hunter a (5), b (6) e YI (7), a amostra T_0 por CIELAB L^* (1), b^* (3), Hunter L (4) e YI (7), enquanto que as amostras T_5 por CIELAB L^* (1), a^* (2), Hunter L (4), a (5) e b (6) (Figura 22).

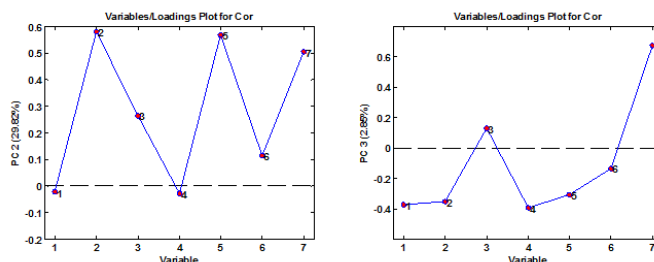


Figura 22. a) Loading de PC2 e b) Loadings de PC3, relacionados com as variáveis de CIELAB L^* (1), a^* (2), b^* (3), HUNTER L (4), a (5), b (6) e YI (7).

5. CONCLUSÕES

A cultivar de azeitona exerce uma influência decisiva ao nível da composição química e das características sensoriais dos azeites. Os azeites elementares, mostraram ter composição distinta entre si, especialmente no perfil sensorial, na composição em ácidos gordos, e no perfil em esteróis.

A adição de extrato de alga no azeite como antioxidante para submetê-lo ao aquecimento pode apresentar aspectos benéficos para o azeite principalmente em relação a sua estabilidade oxidativa.

A presença de extratos de alga altera claramente a atividade antioxidante do azeite, o aumento da resistência à oxidação preservando as propriedades do azeite mesmo durante aquecimento, mas induziu também a um aumento dos coeficientes de extinção, devido à presença de pigmentos. A composição química se mostrou similar em diferentes situações avaliadas, podendo concluir que a alga não tem relação direta com as alterações e sim, o aquecimento.

Este trabalho pode, dar continuidade a outros trabalhos, como por exemplo estudar o efeito da adição de extrato de alga em diferentes cultivares, combinando assim o fator cultivar e extrato para aumento da atividade antioxidante quando exposta a aquecimento.

6. BIBLIOGRAFIA

- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A., & Avallone, S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 349–361.
- Allalout, A., Krichène, D., Methenni, K., Taamalli, A., Oueslati, I., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2009). Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia horticultrae*, **120**, 77-83.
- Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 614-627.
- Aranda, f., Gómez-Alonso, S., Del Álamo, R. R., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry*, **86**, 485-492.
- Ayadi, M. A., Grati-Kamoun, N., & Attia, H. (2009). Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2613-2619.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., & Miled, D. D. B. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, **109**, 743-754.
- Baghel, R. S., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2014). Growth, pigments, and biochemical composition of marine red alga *Gracilaria crassa*. *Journal of Applied Phycology*, **26**, 2143-2150.
- Baiano, A., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2010). Aromatization of olive oil. *Transworld Research Network*, **661**, 1-29.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive Oil Composition. *Olive Oil Chemistry and Technology* (Second Edi., 41-76). AOCS Publishing.
- Boskou, D. (2008). Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health*, 11-44. CRC Press.

- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., & Parenti, A. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, **71**, 553–562.
- Cardoso, L. G. V., Barcelos, M. D. F. P., de Oliveira, A. F., Pereira, J. D. A. R., de Abreu, W. C., Pimentel, F. A., Cardoso, M. G., & Pereira, M. C. A. (2010). Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais - Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, **31**, 127-136.
- Casas, J. S., Bueno, E. O., García, A. M. M., & Cano, M. M. (2004). Sterol and erythrodiol+ uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food chemistry*, **87**, 225-230.
- Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2972–2979.
- Cayuela, J. A., García Martos, J. M., & Gutiérrez-Rosales, F. (2006). Influencia de la producción integrada del olivar sobre la calidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, **57**, 422-428.
- Ceron, M. C., Campos, I., Sanchez, J. F., Acien, F. G., Molina, E., & Fernandez-Sevilla, J. M. (2008). Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 11761-11766.
- Commission Regulation (EC) No 1989/2003 of 6 November 2003, amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis.
- Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991, on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis.
- COI- Conselho Oleícola Internacional - COI/T.15/NC nº 3/Rev. 8. Normas para comércio padrão aplicado aos azeites e óleos de bagaço de azeitona. Madrid: COI, 2015.

- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*, **25**, 155-171.
- Criado, M. N., Motilva, M. J., Goñi, M., & Romero, M. P. (2007). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. *Food Chemistry*, **100**, 748-755.
- Criado, M.-N., Romero, M.-P., Casanovas, M., & Motilva, M.J., (2008). Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*, **110**, 873–880.
- Cunha, S., Amaral, J.S., Fernandes, J.O. & Oliveira, M.B.P.P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3351-3356.
- Dwyer, J. H., Navab, M., Dwyer, K. M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merz, N. B., & Fogelman, A. M. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Circulation*, **103**, 2922-2927.
- Farag, R. S., El-Baroty, G. S., & Basuny, A. M. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cv. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 81-87.
- Farinelli, D., & Tombesi, S. (2015). Performance and oil quality of ‘Arbequina’ and four Italian olive cultivars under super high density hedgerow planting system cultivated in central Italy. *Scientia Horticulturae*, **192**, 97-107.
- Fernández-Sevilla, J. M., Fernández, F. A., & Grima, E. M. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**, 27-40.
- Firestone, D. (2005). Olive Oil. In F.Shahidi (Ed.), *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, Volumes **1-6** (6th Edition, 303-331). John Wiley & Sons.

- García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2008). Virgin olive oil- Chemical implications on quality and health. *European journal of lipid science and technology*, **110**, 602-607.
- Ghanbari, R., Farooq, A., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review. *International journal of molecular sciences*, **13**, 3291-3340.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). *Food chemistry*, **78**, 207-211.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., Pera, L., & Dugo, G. (2007). Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food chemistry*, **101**, 833-837.
- Guiné, R. P. F. (2014). Chemistry and bioactive components of olive oil. In: Virgin Olive oil. Leonards, A. (Ed.), *Virgon olive oil - production, composition, uses and benefits for man*, Nova publishers, New York, Estados Unidos, 1-13.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, **41**, 433-440.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2009). Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETC in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International*, **42**, 1067-1076.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, **9**, 625-644.
- Gunstone, F. (Ed.). 2011. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
- Gutiérrez, A. F., & Carretero, A. S. (2009). *El aceite de oilva virgen: Tesoro de Andalucía. 13 perspectivas concatenadas*. Fundación Unicaja, Málaga.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2005). Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on

phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8054-8062.

Kiritsakis, K.; Kyritsakis, A.; & Mavroudi, N. (2001). Fats and Oils. In *The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion*. Ed. Matalas, A.-L.; Zampelas, A.; Stavrinou, V.; Wolinsky, I.; CRC Press, Boca Raton, 77-96. ISBN: 0-8493-0110-6.

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 459-516.

Laguette, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244-282.

Lalas, S., & Dourtoglou, V. (2003). Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**, 579-583.

Limón, P., Malheiro, R., Casal, S., Fernández, F. A., Fernández-Sevilla, J. M., Rodrigues, N., Cruz, R., Bermejo, R., & Pereira, J. A. (2015). Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts. *Food Chemistry*, **175**, 203-211.

López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M. T., Sánchez-Muniz, F., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Science*, **83**, 492-498.

López-Cortés, I., Salazar-García, D. C., Velázquez-Martí, B., & Salazar, D. M. (2013). Chemical characterization of traditional varietal olive oils in East of Spain. *Food Research International*, **54**, 1934-1940.

López-López, A., Cortés-Delgado, A., & Garrido-Fernández, A. (2015). Effect of green Spanish-style processing (Manzanilla and Hojiblanca) on the quality parameters and fatty acid and triacylglycerol compositions of olive fat. *Food Chemistry*, **188**, 37-45.

- Luaces, P., Pérez, A. G., García, J. M., & Sanz, C. (2005). Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food chemistry*, **90**, 169-174.
- Malheiro, R., Oliveira, I., Vilas-Boas, M., Falcão, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2009). Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 92-97.
- Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E., & Pereira, J. A. (2011). *Microwave heating : a time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation?*. INTECH-Open Access Publisher.
- Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating? *Food Research International*, **48**, 148-154.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2013)a. Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 509-521.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Pereira, J. A., & Casal, S. (2013)b. The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, **44**, 37-43.
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2014). How agronomic factors affects olive oil composition and quality. In: *Virgin Olive oil*. Leonards, A. (Ed.), *Virgon olive oil - production, composition, uses and benefits for man*, Nova publishers, New York, Estados Unidos, 119-141.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., & Pereira, J. A. (2015). Olive oil phenolic composition as affected by geographic origin, olive cultivar, and cultivation systems. In: *Olive and Olive oil Bioactive constituents*. (Ed), AOCS press, Urbana, Illinois. 93-121.
- Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M., & Oliveira, M.B.P.P., (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry*, **102**, 406-414.

- Matthäus, B., & Özcan, M. M. (2011). Determination of fatty acid, tocopherol, sterol contents and 1,2- and 1,3-diacylglycerols in four different virgin olive oil. *Journal of Food Processing & Technology*, **02**, 1-4.
- Medina, V. S., Calderón-Santiago, M., Riachy, M., Priego-Capote, F., & Castro, M. D. L. (2015). Influence of genotype on the fatty acids composition of virgin olive oils from advanced selections obtained by crosses between Arbequina, Picual, and Frantoio cultivars along the ripening process. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **117**, 1261-1270.
- Mendoza, M. F., Gordillo, C. M., Expósito, J. M., Casas, J. S., Cano, M. M., Vertedor, D. M., & Baltasar, M. N. F. (2013). Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food chemistry*, **141**, 2575-2581.
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., & Akhavan, S. (2015). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, **190**, 513-519.
- Moyano, M. J., Meléndez-Martínez, A. J., Alba, J., & Heredia, F. J. (2008). A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform colour spaces. *Food Research International*, **41**, 513-521.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H., & Satomi, Y. (2009). Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483**, 165-168.
- Nunes, C. A., Souza, V. R. D., Corrêa, S. C., Silva, M. D. C. D. C., Bastos, S. C., & Pinheiro, A. C. M. (2013). Heating on the volatile composition and sensory aspects of extra-virgin olive oil. *Ciencia e Agrotecnologia*, **37**, 566-572.
- Ozawa, Y., Sasaki, M., Takahashi, N., Kamoshita, M., Miyake, S., & Tsubota, K. (2012). Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Current Pharmaceutical Design*, **18**, 51-56.
- Patumi, M., Dōandria, R., Marsilio, G., Fontanazza, G., Morelli, G., & Lanza, B. (2002). Olive and olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, **77**, 27-34.

- Pirastru, L., Darwish, M., Chu, F. L., Perreault, F., Sirois, L., Sleno, L., & Popovic, R. (2012). Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. *Journal of Applied Phycology*, **24**, 117-124.
- Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 31-39.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., & Quiles, J.L. (2006). Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. Olive oil and health. *CAB International*, 45-61.
- Ramos-Escudero, F., Morales, M. T., & Asuero, A. G. (2015). Characterization of bioactive compounds from monovarietal Virgin Olive Oils: Relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *International Journal of Food Properties*, **18**, 348-358.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, **55**, 207-216.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **26**, 1231–1237.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Fregapane, G., Salvador, M. D., & Simal-Gándara, J. (2015). Characterisation of extra virgin olive oils from Galician autochthonous varieties and their co-crushings with Arbequina and Picual cv. *Food Chemistry*, **176**, 493-503.
- Rodrigues, N., Malheiro, R., Casal, S., Manzanera, M. C. A. S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). Influence of spike lavender (*Lavandula latifolia* Med.) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave heating. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 2894-2901.
- Salvador, M. D., Aranda, F., & Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on ‘Cornicabra’ virgin olive oil quality A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, **73**, 45-53.

- Sánchez, J.L., Carretero, A.S., & Gutiérrez, A.F. (2001). Composición del aceite de oliva. In I. Omega 3 & F. Puleva (Eds.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*, 195-224. Granada.
- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Ación, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008)a. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, **43**, 398-405.
- Sánchez, J. F., Fernández-Sevilla, J. M., Ación, F. G., Cerón, M. C., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008)b. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 719-729.
- Sena-Moreno, E., Alvarez-Ortí, M., Zied, D. C., Pardo-Giménez, A., & Pardo, J. E. (2015). Olive oils from Campos de Hellin (Spain) exhibit significant varietal differences in fatty acid composition, sterol fraction, and oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **117**, 967-975.
- Shaker, E. S. (2006). Antioxidative effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. *LWT-Food Science and Technology*, **39**, 883-892.
- Shyamala, B. N., Gupta, S., Lakshmi, A. J., & Prakash, J. (2005). Leafy vegetable extracts—antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **6**, 239-245.
- Silva, R. A., Petter, C. O., & Schneider, I. A.H. (2007). Avaliação da perda da coloração artificial de agatas. *Revista Escola de Minas*, **60**, 477-482.
- Sousa, A., Casal, S., Malheiro, R., Lamas, H., & Bento, A. (2015). Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT-Food Science and Technology*, **60**, 22-28.
- Tovar, M. J., Motilva, M. J., Luna, M., Girona, J., & Romero, M. P. (2001). Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **78**, 843-849.

- Tura, D., Gigliotti, C., Pedò, S., Failla, O., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2007). Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea L.*) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae*, **112**, 108-119.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, B. M., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea L.*): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, **89**, 561-568.
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., & Galli, C. (2006). Antioxidant Properties of Olive Oil Phenolics. *Olive oil and health*, 109-116. CAB International.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., & Rissanen, T. H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *The American journal of clinical nutrition*, **83**, 1265-1271.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat science*, **78**, 343-358.