

Efeito da aplicação de bioestimulantes na qualidade dos frutos e respectivos azeites da cv. Cobrançosa

Daniele Zago

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

Orientado por

Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues

Professor Doutor Gilmar Antônio Nava

**Bragança
2023**

Aos meus pais!

Agradecimentos

Ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Dois Vizinhos, pela oportunidade de realizar esse mestrado no âmbito de Dupla Diplomação.

Ao meu orientador do Instituto Politécnico de Bragança, Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues pelo seu apoio, ajuda, disponibilidade e incentivo durante todas as etapas do trabalho.

Ao meu co-orientador da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos, Professor Doutor Gilmar Antônio Nava, por todo auxílio e incentivo que mesmo à distância foi essencial.

Ao Francisco Pavão por ter cedido a parcela do olival na qual foi realizado todos os ensaios e à empresa Hubel Verde por aceitar colaborar com o experimento por meio do fornecimento dos bioestimulantes.

A todos os colegas de laboratório, em especial ao Nuno Ferreira e à Sandra Lamas, por toda ajuda, paciência, disponibilidade e atenção, desde as idas ao campo até nos ensaios laboratoriais, todo apoio, incentivo e bom humor foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me proteger e guiar meus passos.

Aos meus pais, minha base, minha maior fonte de inspiração, que mesmo distantes, não mediram esforços para se fazerem presentes, me apoiando, ajudando e dando todo incentivo para que eu pudesse realizar os meus sonhos, mesmo que isso incluiria viver em outro país por um tempo. Tudo o que vivi não seria possível sem eles.

Às minhas irmãs, que mesmo distantes se fizeram presentes e me deram apoio.

À minha amiga e colega de mestrado Aline Azeredo Castanha, pela sua amizade durante todo esse tempo, seu apoio e ajuda na realização de todos os trabalhos, à sua disposição e incentivo foram fundamentais para mim durante toda a minha estadia em Portugal.

Às amigas que Bragança me proporcionou, Maria Isabel, Larisa, Camila, Ana Beatriz, Ester e Cecília, que foram pessoas essenciais durante toda essa caminhada.

A Portugal, onde tive a oportunidade de conhecer uma nova cultura, novos lugares, fazer novos amigos, viver muitas experiências e aprender muitas coisas.

Índice

| | |
|--|------|
| Resumo | viii |
| Abstract..... | ix |
| 1. Introdução..... | 2 |
| 2. Referencial teórico..... | 6 |
| 2.1. A cultura da oliveira | 6 |
| 2.2. Composição e qualidade do azeite..... | 7 |
| 2.3. Problemas da oliveira face às alterações climáticas | 9 |
| 2.4. Soluções usadas para minimizar os efeitos da seca | 10 |
| 3. Material e métodos | 14 |
| 3.1. Caracterização da área de estudo e estabelecimento dos ensaios de campo | 14 |
| 3.2. Biometria das azeitonas | 15 |
| 3.3. Análise da atividade antioxidante dos frutos..... | 15 |
| 3.3.1. Extratos vegetais | 15 |
| 3.3.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)..... | 16 |
| 3.3.3. Fenóis totais | 17 |
| 3.3.4 Poder redutor | 17 |
| 3.4. Avaliação da composição do azeite..... | 18 |
| 3.4.1 Colheita das azeitonas..... | 18 |
| 3.4.2 Extração Abencor | 18 |
| 3.4.3. Parâmetros de qualidade | 19 |
| 3.4.5 Avaliação da estabilidade oxidativa | 21 |
| 3.4.6. Atividade antioxidante dos azeites | 22 |
| 3.4.6.1. Extração das amostras de azeites | 22 |
| 3.4.6.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)..... | 22 |
| 3.4.6.3. Fenóis totais | 23 |
| 3.4.6.4. Atividade Sequestradora do Radical ABTS | 23 |
| 3.5. Análise estatística | 23 |
| 4. Resultados e discussão | 26 |
| 4.1. Biometria dos frutos e endocarpo..... | 26 |
| 4.2. Atividade antioxidante..... | 27 |
| 4.2.1 Análise DPPH..... | 27 |
| 4.2.2 Fenóis totais | 28 |
| 4.2.3 Poder redutor | 29 |
| 4.3. Determinação da qualidade dos azeites | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 Parâmetros de qualidade | 30 |
| 4.3.2 Estabilidade oxidativa..... | 33 |
| 4.3.3 Atividade antioxidante dos azeites | 34 |
| 4.3.4 Análise sensorial dos azeites | 37 |
| 4.3.5 Análise de Componentes Principais (PCA)..... | 42 |
| 5. Conclusão | 44 |
| 6. Referências | 45 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Caracterização da área onde foram aplicados os bioestimulantes. | 14 |
| Figura 2 Processo de extração dos compostos antioxidantes | 16 |
| Figura 3 Amostra de extrato | 16 |
| Figura 4 Equipamento Rancimat | 22 |
| Figura 5 Valores médios da percentagem de inibição de DPPH dos extratos de azeitonas expresso em % de inibição DPPH. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas. | 28 |
| Figura 6 Valores médios do teor de fenóis totais em extratos de azeitonas expressos em mg ácido gálico/grama de amostra. Letras minúsculas iguais significam que não houve diferenças estatísticas significativas. | 29 |
| Figura 7 Valores médios do ensaio do poder redutor expressos em mg Trolox/grama de amostra. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.... | 30 |
| Figura 8 Estabilidade oxidativa dos azeites extraídos de azeitonas tratadas com diferentes bioestimulantes. | 33 |
| Figura 9 Valores médios de atividade antioxidante dos azeites avaliadas pelos métodos de DPPH e ABTS. | 35 |
| Figura 10 Fenóis totais em azeites | 36 |
| Figura 11 Boxplots relativo as sensações olfativas dos azeites. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey). | 38 |
| Figura 12 Boxplots das sensações gustativas dos azeites. Letras minúsculas indicam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey) | 40 |
| Figura 13 Boxplots das sensações gustativas doce, amargo e picante dos azeites. Letras diferentes representam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey) | 41 |
| Figura 14 Diferenciação das sensações olfativas e gustativas dos azeites extraídos de oliveiras cv. Cobrançosa tratadas com diferentes bioestimulantes: PCA – Biplot com base na análise sensorial. | 42 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Valores médios, \pm desvio padrão, valores mínimos e máximos da biometria dos frutos e endocarpos | 26 |
| Tabela 2 Valores médios, \pm desvios padrões, valores mínimos e máximos dos parâmetros de qualidade. | 31 |

Resumo

A olivicultura apresenta grande importância para os países da bacia do Mediterrâneo, pelo seu valor económico, social e cultural. Em Portugal, a região de Trás-os-Montes é considerada uma das mais importantes regiões produtoras de azeites, ocupando atualmente o segundo lugar na produção nacional. Na região os olivais são caracterizados por parcelas pequenas, onde as oliveiras estão plantadas em modo tradicional e em regime de sequeiro. Nos últimos anos, perante situações de clima extremo, têm-se gerado problemas relacionados com a falta de recursos hídricos, ocasionando algumas situações de stresses na produção das oliveiras. Torna-se assim necessário encontrar soluções para mitigar esses efeitos. Várias empresas do sector agrícola começam a lançar no mercado diferentes produtos com efeito protetor, contudo, pouco ainda se sabe sobre os efeitos na composição e qualidade dos produtos da oliveira. Assim, o presente trabalho teve como objectivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes bioestimulantes à base de extratos de algas em oliveiras da cv. Cobrançosa, ao nível da morfologia e atividade antioxidante dos frutos e composição e qualidade dos respetivos azeites. Para isso, em um olival tradicional de Trás-os-Montes, selecionou-se 100 plantas, divididas em 5 blocos com 20 plantas cada, em que foi efetuada aplicação dos bioestimulantes (T1) e-Dalgin, (T2) Fitoalgas Green (T3) Algaman Be (T4) Dalgin Mg. Nos frutos e endocarpos avaliou-se o peso, diâmetro e comprimento. Através dos extratos metanólicos das azeitonas determinou-se a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, fenóis totais e poder redutor. Nos azeites, avaliou-se os parâmetros de qualidade (acidez, índice de peróxidos, K_{232} e K_{268}), o perfil sensorial, assim como a estabilidade oxidativa e a atividade antioxidante (DPPH, ABTS e fenóis totais). Nos frutos e endocarpos apenas T3 (Algaman B) respondeu significativamente. A atividade antioxidante através do DPPH variou de 42,86% a 34,48%, fenóis totais 38,68 a 37,11 mg ác. Gálico/g de amostra e poder redutor 123,66 a 104,64 mg Trolox/g de amostra. Nos azeites, os valores obtidos por meio dos parâmetros de qualidade permitiram classificá-los como azeite virgem extra. A estabilidade oxidativa não apresentou diferenças significativas nos tratamentos variando de 21,9 a 22,8 horas. Na atividade antioxidante o tratamento com Fitoalgas Green obteve os menores valores. Os azeites apresentaram maior sensação de amargo e picante. Verificou-se também que a aplicação de bioestimulantes levou a um decréscimo da sensação de frutado e sensações de outros frutos.

Palavras chave: Mitigação; Extratos de algas; Atividade antioxidante; Parâmetros de qualidade; Análise sensorial;

Abstract

Olive growing has great importance to the countries of the Mediterranean basin, due to its economic, social, and cultural value. In Portugal, the Trás-os-Montes region is considered one of the most important olive oil-producing regions, currently holding second place in national production. In the region, the olive grove are characterized by small plots where the olive trees are planted in the traditional way and in a rainfed system. In recent years, faced with situations of extreme weather, problems related to the lack of water resources have been generated, causing some stress situations in the production of olive trees. It is therefore necessary to find solutions to mitigate these effects. Several companies in the agricultural sector are starting to launch different products with a protective effect on the market, but little is known about the effects on the composition and quality of olive products. Thus, the present work aimed to evaluate the effect of applying different biostimulants based on seaweed extracts in olive trees of cv. Cobrançosa, in terms of fruit morphology and antioxidant activity and composition and quality of the respective olive oils. For this, in a traditional olive grove in Trás-os-Montes region, 100 plants were selected, divided into 5 blocks with 20 plants each, in which the biostimulants were applied (T1) e-Dalgin, (T2) Fitoalgas Green, (T3) Algaman B and (T4) Dalgin Mg. In the fruits and endocarps, the weight, diameter, and length were evaluated. Through the methanolic extracts of the olives, the antioxidant activity was determined by the DPPH methods, total phenols, and reducing power. In the oils, the quality parameters (acidity, peroxide index, K_{232} and K_{268}), the sensory profile, as well as the oxidative stability and antioxidant activity (DPPH, ABTS and total phenols) were evaluated. In fruits and endocarps only T3 (Algaman B) responded significantly. Antioxidant activity through DPPH ranged from 42.86% to 34.48%, and total phenols from 38.68 to 37.11 mg ac. Gallic/g of sample and reducing power 123.66 to 104.64 mg Trolox/g of the sample. In olive oils, the values obtained through the quality parameters allowed classifying them as extra virgin olive oil. Oxidative stability did not show significant differences in treatments ranging from 21.9 to 22.8 hours. In the antioxidant activity, the treatment with Fitoalgas Green obtained the lowest values. The olive oils showed a greater sensation of bitterness and pungency. It was also found that the application of biostimulants led to a decrease in the fruity sensation and sensations of other fruits.

Keywords: Mitigation; Seaweed Extract; Antioxidant activity; Quality Parameters; Sensory Analysis;

CAPÍTULO I

Introdução

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é considerada uma cultura de maior expressão na Bacia do Mediterrâneo, apresentando uma grande importância económica e sociocultural para muitos países. Só a União Europeia é detentora de 73% da produção mundial de azeite (Peres et al., 2017) o que justifica a sua relevância. O seu cultivo é antigo, compreendendo quase 6000 anos e sua zona de origem engloba o Sul do Cáucaso incluindo planícies do Irã, Palestina, costa da Síria, expandindo-se do Chipre ao Egito até os países do Mediterrâneo (Coutinho et al., 2009). De acordo com Gonçalves (2014) é uma planta com origem na Ásia menor e teve sua distribuição espalhada na região do Mediterrâneo por meio das invasões e trocas comerciais que ocorreram nesta área.

O cultivo de oliveiras a nível global está próximo de 750 milhões de plantas, sendo que 98% da área total, 99% das árvores em produção e 99% da produção total de azeitonas está concentrada nos países da bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio (Ghanbari et al., 2012). Os países que se destacam na produção de azeite são a Espanha, Itália, Grécia, Tunísia, Turquia, Marrocos e Portugal (Filoda et al., 2021).

Em Portugal, a oliveira encontra-se dispersa ao longo de todo o território com principal presença em regiões do interior. Trás-os-Montes é considerada uma das mais importantes regiões produtoras de azeite. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (2022a) no ano de 2021, a mesma contava com uma área de oliveira plantada de 81 610 hectares. Delimitada pela província do Minho (oeste), Douro (sul), rio Douro (leste) e Espanha (norte) e devido ao clima ser caracterizado como sub-atlântico ou continental e mediterrâneo, a região recebe algumas designações como “Terra Fria de Planalto”, “Terra Fria de Montanha”, “Terra Fria de Alta Montanha” e “Terra Quente (Gonçalves & Gaivão, 2021). No que diz respeito à produção de azeite de Trás-os-Montes, o modo de produção semi-intensivo, ocupa apenas 35% da área nacional de olival (Fernandes-Silva et al., 2018). A restante área é ocupada por olivais tradicionais e por olivais intensivos. No que respeita aos produtos derivados da azeitona, estes estão ganhando importância, pelas suas características sensoriais exclusivas que apresenta, além das vantagens que proporcionam na saúde pelo seu consumo (Sousa et al., 2015). O azeite assim como a azeitona de mesa são produtos que fazem parte da dieta mediterrânea (Gouveias et al., 2017). A produção, bem como o consumo de azeite no mundo, tem crescido significativamente nos últimos tempos, isso porque o mesmo se destaca dentre outros tipos de óleos vegetais e gorduras, como o mais saudável (Sousa et al., 2013). A composição dos azeites é diversificada, sendo mais de 230 compostos presentes em sua

constituição, como por exemplo, os álcoois alifáticos e triterpênicos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis além de compostos fenólicos (Souza et al., 2022).

Segundo Freitas et al., (2022) na composição do azeite existem certos antioxidantes naturais que colaboram na melhoria da qualidade de vida de quem faz o seu consumo, sendo estes as clorofilas, carotenóides, compostos fenólicos e tocoferóis. Contudo, a sua composição vai-se alterando em função das condições edafoclimáticas durante a produção. As alterações climáticas têm sido uma constante ao longo dos tempos. No último século, o ritmo a que ocorreram sofreu uma forte aceleração, com tendência a agravar os seus efeitos num futuro próximo. A ocorrência de ondas de calor e secas são fenómenos cada vez mais frequentes, com fortes impactos nos agroecossistemas levando a perdas agrícolas. No entanto, têm surgido alguns produtos no mercado que ajudam a mitigar o efeito de stresses abióticos nas plantas nomeadamente produtos obtidos de extratos de algas *Ascophyllum nodosum* que estão sendo usados como bioestimulantes na agricultura (Galindo et al., 2015) e também de *Ecklonia maxima*. Vários trabalhos relatam que o emprego dos bioestimulantes na agricultura vem aumentando com intuito de auxiliar na produção agrícola (Santini et al., 2015) . A sua utilização nas plantas pode proporcionar aumento na absorção de água e também de nutrientes, como pode auxiliar na resistência aos stresses hídricos (Galindo et al., 2019) .

Na olivicultura, a utilização dos bioestimulantes ainda é reduzida, sendo escassas as informações acerca dos benefícios da aplicação com intuito de atenuar os impactos dos stresses bióticos e abióticos (Dias et al., 2022a). Existe escassa informação acerca de seus efeitos a nível da planta, bem como sua influência na composição e qualidade do fruto e azeite. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito da aplicação de bioestimulantes comerciais à base de algas ao nível da morfologia, e composição química dos frutos e respetivos azeites da cv. Cobrançosa.

Como objetivos específicos, a presente dissertação pretende avaliar o efeito da aplicação de bioestimulantes na:

- Morfologia do fruto e respetivo endocarpo;
- Composição química do fruto por meio da análise dos fenóis individuais e atividade antioxidante.
- Qualidade e composição dos azeites, através da determinação da acidez, índice de peróxido e coeficiente de extinção específica, análise sensorial descritiva, estabilidade oxidativa pelo método rancimat, determinação dos antioxidantes e fenóis individuais.

A dissertação encontra-se estruturada em cinco partes distintas. Na próxima seção faz-se uma breve abordagem bibliográfica da cultura da oliveira e do efeito que as alterações climáticas têm sobre esta cultura assim como do uso de bioestimulantes na mitigação de problemas causados pelo calor (Capítulo 2). O terceiro capítulo é destinado ao material e métodos onde é mostrado o desenho experimental assim como as metodologias aplicadas para a execução deste trabalho. No quarto capítulo são apresentados os resultados do presente trabalho, procedendo-se à sua discussão. Apresentam-se também, as conclusões (Capítulo 5) e apontam-se sugestões para a possível continuação do trabalho no futuro.

CAPÍTULO II

Referencial teórico

2. Referencial teórico

2.1. A cultura da oliveira

A oliveira, faz parte da família Oleaceae a qual abrange espécies espalhadas em zonas tropicais e temperadas do planeta (Coutinho, 2015) mas é a única dentro da família que produz frutos comestíveis (Oliveira et al., 2021). O seu diferencial em relação a outras frutíferas, está no seu tempo de vida, podendo atingir centenas de anos (Pacetta, 2013). De acordo com Bracci et al., (2011), “A oliveira é a segunda fruta oleaginosa mais importante cultivada em todo mundo, depois do dendê”. Atualmente, os países da bacia do Mediterrâneo cultivam 98% das azeitonas (Torres et al., 2017). Na Europa, os países que se destacam na produção da oliveira são Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia (Wrege et al., 2015a). A oliveira é uma cultura que tem relevância no setor económico, quer para a extração de azeite, na produção de azeitona de mesa e na composição e proteção da paisagem local (Sales et al., 2020).

Classificada como planta perene e lenhosa, de porte médio, com cerca de 4 a 8 metros de altura, é uma frutífera que tem preferência por clima temperado (Salomão, 2019). No entanto, de acordo com Coutinho et al., (2009) o seu cultivo é realizado em zonas semiáridas do mediterrâneo, com altas temperaturas e pouca chuva no verão, em torno de 250 a 550 mm durante o ano. Destaca-se por ser uma espécie robusta que tem boa adaptabilidade para as condições edafoclimáticas presentes na região mediterrânea (Gonçalves, 2016). Seu tronco apresenta diâmetro expressivo, sendo na maioria das vezes, dobrado e torcido (Hashmi et al., 2015). Suas folhas são classificadas como simples com formato elíptico ou lanceolada, apresentando de 5 a 7 cm de comprimento e 1,0 a 1,5 cm de largura, além de apresentar coloração verde-escura na face adaxial e esbranquiçada na face abaxial (Oliveira et al., 2003), além de serem coriáceas e ter cutícula grossa (Wrege et al., 2015b). No que diz respeito à florescência, esta pode apresentar de 15 a 30 flores com coloração branco cremoso e de tamanho pequeno (Therios, 2009). Em relação ao fruto, a azeitona é considerada uma drupa em formato oval tendo tamanho de 2 a 3 cm e com 3,0-6,5 de proporção polpa por caroço, sendo que, o epicarpo, mesocarpo e endocarpo são as três partes que compõe o fruto (Ghanbari et al., 2012). Apresenta sabor amargo forte que decresce ao longo do amadurecimento (Conte et al., 2020). O seu tamanho pode variar de acordo com a cultivar, podendo o fruto pesar de 1 a 10 gramas (Nazir et al., 2022). A sua colheita ocorre de outubro a janeiro (no hemisfério norte), variando de acordo com as condições climáticas de cada ano (Serrano et al., 2016). A produção do fruto ocorre em plantas com idade de 3 a 4 anos, no entanto,

o óptimo de produção só é alcançado em oliveiras com 12 a 20 anos de idade dependendo da cultivar (Ozturk et al., 2021). A oliveira apresenta ciclo bienal, em que no primeiro ano ocorre a produção dos botões e indução floral e a floração, frutificação, crescimento bem como o desenvolvimento do fruto acontecem apenas no segundo ano (Duarte et al., 2015). Em Portugal, a oliveira é uma cultura com grande importância e tradição. Nos últimos anos, tem-se verificado a plantação de novos olivais sobretudo olivais de alta densidade. Continuando a este ritmo, nos próximos 10 anos, Portugal pode ser considerado o terceiro maior produtor de azeite, em razão das modernizações ocorridas nos olivais (Sales et al., 2020). Só no ano de 2021 a produção de azeite no país foi considerada a maior dos últimos anos, sendo estimada em 2,29 milhões de hectolitros (INE, 2022b). O diferencial do setor oleícola português está na existência de várias cultivares autóctones, apresentando ampla variedade em importantes regiões de cultivo (Rodrigues et al., 2023). A Cobrançosa é considerada a mais importante cultivar para a produção de azeites nesta região (Sousa et al., 2014), tendo uma representatividade de 30% do total (Fernandes-Silva, et al., 2018). De acordo com Peres et al., (2011) as características de clima e solo aliadas as cultivares e práticas culturais desta região, favorecem o cultivo de azeitonas e azeites produzidos com características exclusivas e de óptima qualidade.

2.2. Composição e qualidade do azeite

Caracterizado como o óleo proveniente dos frutos da oliveira, o azeite é obtido exclusivamente por processos mecânicos (Silva et al., 2019), reconhecido como um produto com elevada qualidade sendo um dos óleos mais apreciados no mundo (Mello & Pinheiro, 2012; Bouarroudj et al., 2016). O azeite é considerado um dos pilares da dieta mediterrânica, graças à sua composição em ácidos gordos monoinsaturados e pelo seu elevado poder antioxidante responsável em proporcionar vários benefícios para a saúde (Brito et al., 2019). O azeite apresenta outros constituintes na sua composição. Encontra-se dividido em fração saponificável (compreendendo cerca de 98% do seu peso total) e pela fração insaponificável (Silva, 2008). A fração saponificável é constituída principalmente pelos triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, fosfolipídios, ésteres de esteróis e também por ácidos gordos (Castillo-Luna et al., 2022). Os triglicerídeos ou triacilgliceróis são classificados como triésteres de ácidos gordos e glicerol (Da Silva Bragueroli et al., 2019). Na composição do azeite o ácido gordo de maior predominância é o ácido oleico (55%-83%), seguido pelo ácido palmítico (7,5%-20%), ácido linoleico

(3,5%-21%) e também pelo ácido esteárico (0,5%-5%) (Portarena et al., 2019). Wani et al., (2018) ressaltam que a caracterização do perfil dos ácidos gordos se altera de acordo com o índice de maturação, sendo que o ácido oleico é o que se expressa em todos os estágios da maturação. Já no estágio verde, os ácidos que estão em maior presença é o ácido palmítico e oleico, enquanto, os ácidos palmítico, esteárico e linoleico prevalecem no estágio maduro.

Já a fração insaponificável compreende um total de 2% da massa total do azeite, sendo constituída por ceras, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis, compostos voláteis e aromáticos (Ferreira, 2012). Mesmo estando em uma fração menor no azeite, esses constituintes determinam a sua qualidade (Özdemir et al., 2018). Existem dois hidrocarbonetos principais no azeite, sendo o escaleno e β -caroteno (Jimenez-Lopez et al., 2020). O escaleno é considerado um terpenóide que está presente em mais de 90% dessa fração (Gouvinhas et al., 2017). No que diz respeito as cores verde e amarelo do azeite, esta é influenciada pela existência de clorofilas e carotenóides (Boskou et al., 2006). O pigmento de clorofila de mais importância é a clorofila a e posteriormente a clorofila b (Montealegre et al., 2010). Feofitinas “a” e “b”, produtos da oxidação das clorofilas, também se fazem presente (Lozano-Sánchez et al., 2010). Os carotenóides também são constituintes dos azeites, sendo que a luteína e β -caroteno são considerados os mais importantes (Aparicio-Ruiz & Gandul-Rojas, 2014). O β -caroteno tem função antioxidante, podendo impedir a oxidação dos lipídios (Samaniego Sánchez et al., 2007). Os compostos fenólicos apresentam função relevante no que diz respeito as propriedades nutricionais, nos atributos sensoriais, bem como na durabilidade dos azeites (Zhang et al., 2022), além de colaborarem com as características organolépticas (Miho et al., 2021). Os esteróis podem estar na forma livre ou esterificado junto aos ácidos gordos (Cunha et al., 2006). O entendimento sobre eles é de suma relevância no que diz respeito a análise na qualidade nutricional e também no controlo da sua qualidade, por servir de parâmetro na deteção de prováveis fraudes (Alvez et al., 2005). Os tocoferóis, sobretudo o α -tocoferol, são constituintes relevantes no azeite e também colaboram para o valor nutricional (Malheiro et al., 2009). Os tocoferóis e tocotrienóis auxiliam na estabilidade oxidativa, principalmente a fim de impedir a oxidação de ácidos gordos insaturados (Machado et al., 2018). Além disso, os tocoferóis α , β , γ e δ e os tocotrienóis α , β , γ e δ constituem a vitamina E (Montealegre et al., 2010). Compostos voláteis como aldeídos, álcoois, ésteres, hidrocarbonetos, cetonas, furanos são responsáveis pelo aroma do azeite (Kalua et al., 2007).

Determinados compostos auxiliam na formação de um azeite com características únicas (Boskou et al., 2006). De acordo com Lopez et al., (2014) a fração insaponificável coopera com as propriedades específicas do azeite virgem, sobretudo para a estabilidade oxidativa e sabor particular, assim como para a cor. Fatores como cultivar, temperatura e índice de maturação apresentam influência em determinados parâmetros que determinam a qualidade dos azeites (Melo-Abreu et al., 2012). As características físico-químicas do azeite alteram-se perante a classe de solo, o clima, os sistemas culturais, cultivar, índice de maturação da azeitona e pelos métodos de extração (Cardoso et al., 2010). Nos últimos anos, as condições climáticas são os principais fatores que influenciam em determinados parâmetros.

2.3. Problemas da oliveira face às alterações climáticas

A principal problemática na agricultura no século XXI são as mudanças climáticas a nível global, pelo fato que seus efeitos negativos estão a provocar alterações nas múltiplas atividades económicas espalhadas por todo o mundo (Carlos et al., 2019). De acordo com Brito et al., (2019), as alterações climáticas podem comprometer o desenvolvimento bem como a produtividade das culturas (Mairech et al., 2021). De uma maneira geral, perante estas condições climáticas, as plantas podem sofrer com o déficite hídrico aliado a altas temperaturas e radiação solar e pouca humidade atmosférica, condições essas que podem comprometer o crescimento e o desempenho produtivo das mesmas (Silva, 2008). Na oliveira, o clima, temperatura, pluviometria e a humidade relativa, são fatores que dificultam o seu crescimento e desenvolvimento (Costa et al., 2019). Constantemente as oliveiras são expostas a temperaturas elevadas e ao déficite hídrico em regiões áridas e semiáridas (Guo et al., 2018). Portugal não é exceção dessas alterações. Os olivais portugueses estão sujeitos aos stresses térmicos e hídricos ao longo do seu crescimento sazonal, sobretudo em áreas do interior do país durante a estação do verão (Fraga et al., 2020). Mesmo que as oliveiras apresentem capacidade para suportar níveis extremos de stresse hídrico, o crescimento das plantas e brotos, além do desenvolvimento das folhas e formação do fruto, são prejudicados pela seca (Arenas-Castro et al., 2020), além de ocorrer decréscimo na floração e na frutificação (Fraga et al., 2020). Segundo Proietti et al., (2013) a diminuição na fotossíntese foliar ocasionada pelo déficite hídrico, reduz a taxa de crescimento bem como a produção final das azeitonas, provocando maiores alternâncias de produção. As consequências das alterações

climáticas tornam-se desafiadoras na garantia da sustentabilidade da olivicultura (Mairech et al., 2021).

2.4. Soluções usadas para minimizar os efeitos da seca

As alterações climáticas têm provocado novos grandes problemas no sector produtivo. Face a estas alterações, novas técnicas de cultivo precisam de ser implementadas e adequadas às novas situações de clima extremo, visto que os stresses abióticos comprometem o crescimento, desenvolvimento, bem como os processos metabólicos das culturas, o que implica em baixo rendimento e baixa qualidade da produção (Romero et al., 2021). A seca é um dos stresses abióticos mais comuns sentido pelas alterações do clima. É o principal fator responsável por perdas na produtividade das culturas (Bantis & Koukounaras, 2022). A maior parte das regiões do Mediterrâneo onde existe o cultivo da oliveira, estão sujeitas a períodos de escassez hídrica (Ennajeh et al., 2010), aliado a temperaturas e intensidade de luz elevadas, sobretudo no verão (Petridis et al., 2012). É importante implementar novas estratégias a fim de favorecer a as condições produtivas das oliveiras expostas em situações de déficit hídrico, e assim, impedir que o seu desenvolvimento e produtividade não diminua, perante as alterações climáticas sobretudo provocadas pela seca (Tekaya et al., 2022).

A utilização de produtos como os bioestimulantes pode ser um meio de contribuição para que as plantas em geral não sofram com os stresses abióticos, já que os mesmo, operam no incremento hormonal e nutricional (Oliveira et al., 2016). Os bioestimulantes fornecem uma nova perspetiva para a regulação e alteração dos processos fisiológicos nas plantas a fim de promover o crescimento, minimizar os problemas ocasionados pelo stresse e elevar a produtividade das mesmas (Yakhin et al., 2017). O Regulamento (UE) 2019/ 1009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de junho de 2019 define os bioestimulantes para as plantas como sendo produtos com capacidade de favorecer os processos de nutrição sem ter em conta a quantidade de nutrientes do produto, tendo como foco principal proporcionar uma melhor eficiência no uso dos nutrientes, tolerância diante dos stresses abióticos, além do aumento na disponibilidade dos nutrientes no solo ou na rizosfera. Diferentemente dos fertilizantes, os bioestimulantes não fornecem nutrientes de modo direto, no entanto, podem proporcionar as plantas uma melhor capacidade de absorver e assimilar nutrientes, além de auxiliar na tolerância aos stresses abióticos (Corsi et al., 2022).

Na atualidade, estão disponíveis no mercado alguns tipos de bioestimulantes, podendo ser na forma líquida, pó ou granulado, ambos aplicados via foliar por aspersão ou ser aplicado na zona radicular (Dias et al., 2022b). Os bioestimulantes podem ter diversas fontes, podendo ser obtidos a partir de algas marinhas, hidrolisados de proteínas, microrganismos e substâncias húmicas (Corsi et al., 2022). Na oliveira, já foram desenvolvidos alguns estudos com a utilização de bioestimulantes à base de hidrolisados de proteínas aplicado em oliveiras jovens da cultivar Leccino, no qual foi possível verificar um crescimento significativo das plantas perante o controlo (Almadi et al., 2020). Outros bioestimulantes criados à base de extratos de algas marinhas vêm apresentando uma inserção significativa no setor agrícola nesses últimos tempos, isso porque apresentam em sua composição, uma combinação de polissacarídeos, micronutrientes, bem como hormonas de crescimento vegetal, assim, funcionando como bioestimulantes (Shahrajabian et al., 2021; Zielewicz et al., 2021). Mesmo em concentrações menores, os extratos de algas podem provocar diversas reações fisiológicas na planta em geral, pelo estímulo de crescimento, melhora na floração e no rendimento (Battacharyya et al., 2015). Dentro dos diferentes tipos de extratos de algas, destaca-se o *Ascophyllum nodosum*, uma variedade de alga marinha que tem sua distribuição no Oceano Atlântico Norte e que mais tem sido empregada como bioestimulantes (Bajpai et al., 2019). Apresenta na sua composição alguns compostos como ácido algínico, lipídios, manitol, proteínas, fibras, fucoidanos, fenóis, além de conter pigmentos, vitaminas, hormonas e enzimas (Pereira et al., 2020).

Vários produtos à base de *A. nodosum* estão disponíveis no mercado, como por exemplo o Dalgin Mg, que apresenta em sua constituição 60 macro e micronutrientes, além de hidratos de carbono, aminoácidos e promotores de crescimento de crescimento naturais. A sua aplicação é feita por via foliar e é um produto recomendado para a cultura da oliveira (Hubel Verde, 2017b). Outro produto é o e-Dalgin, sendo constituído em 100% de extrato de alga a base de *A. nodosum*, apresentando uma fonte natural tanto de macro e micronutrientes, bem como aminoácidos e hidratos de carbono, promotores de crescimento e é indicado para aplicações foliares (Hubel Verde, 2015). Fitoalgas Green também é um produto 100% à base de alga *A. nodosum*, sendo constituído pelo extrato puro desta alga e que apresenta diversos benefícios quando aplicado nas plantas, incluindo auxílio na resistência à seca, proteção das plantas devido ao danos ocasionados pelos stresses, induz a melhoria da floração e vingamento, proporcionando aumento na qualidade da produção entre outras vantagens (Tradecorp, 2020). O bioestimulante

Algaman B é formulado a partir de extrato de alga *Ecklonia maxima* e boro, promovendo o crescimento de tecidos nas plantas, seja radiculares ou reprodutivos, além de apresentar atividade repelente às plantas contra insectos também auxilia na resistência da planta a temperaturas baixas e outros agentes causadores de stress (Hubel Verde, 2017a).

CAPÍTULO III

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Caracterização da área de estudo e estabelecimento dos ensaios de campo

O ensaio foi realizado num olival tradicional da Terra Quente Transmontana, localizado em Suções no Concelho de Mirandela, Portugal nas coordenadas 41°30'7.81 N e 7°15'0.77W. As plantas do olival eram todas da cultivar Cobrançosa e tinham aproximadamente 20 anos com um espaçamento de plantação de 7×7 metros. A parcela selecionada tinha aproximadamente 1,5ha de área e encontrava-se em regime de sequeiro.

Para a realização do ensaio, selecionaram-se 100 plantas constituindo cinco blocos com 20 plantas cada (Figura 1). Para cada bloco foi realizado um tratamento, sendo o controlo (C), pulverizado apenas com água, tratamento 1 (T1) com e-Dalgin (2mL/L), tratamento 2 (T2) com Fitoalgas Green (1mL/L), tratamento 3 (T3) com Algaman B (2mL/L) e tratamento 4 (T4) com Dalgin Mg (2,5mL/L). Os produtos utilizados no tratamento 1, 3 e 4 foram fornecidos pela empresa Hubel Verde, empresa especializada na prestação de serviços e venda de produtos de engenharia e tecnologia agrónómica. Já o produto usado no tratamento 2 foi fornecido pelo agricultor.

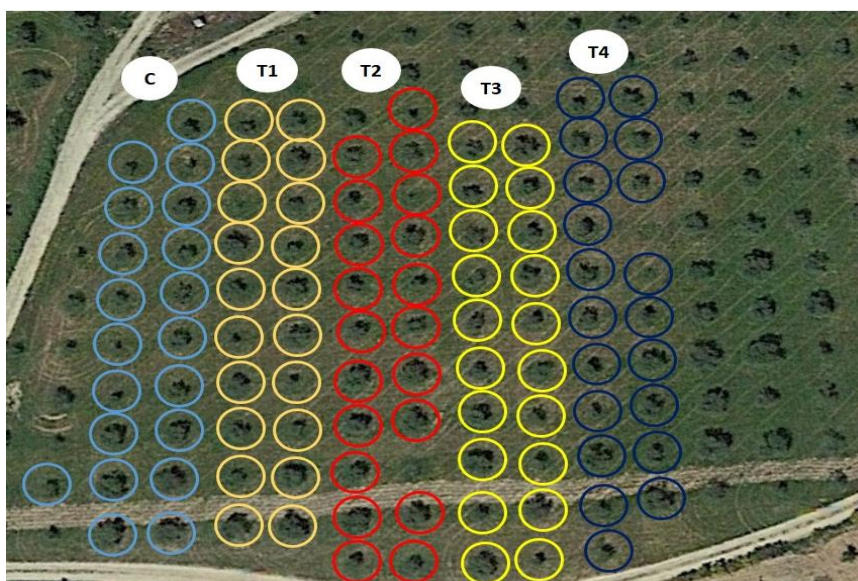


Figura 1 Caracterização da área onde foram aplicados os bioestimulantes.

Foram efetuadas duas aplicações com a utilização de um pulverizador manual. A primeira aplicação foi feita a 02 de maio de 2022 e a segunda no dia 15 de junho, totalizando um intervalo de 44 dias. Foram depois feitos os tratamentos normais que se efetuam no olival durante o seu ciclo de crescimento. A colheita das azeitonas foi realizada no dia 30 de outubro de forma totalmente manual. Uma parte das azeitonas

colhidas foi utilizada para determinação da biométrica e posteriores análises da atividade antioxidante e o restante foi encaminhada para a extração de azeite.

3.2. Biometria das azeitonas

Em laboratório selecionou-se 40 frutos por árvore num total de cinco árvores cada tratamento. A biometria dos frutos e endocarpos foi realizada mediante os parâmetros biométricos estabelecidos por UPOV (UPOV, 2011), com a utilização de 40 azeitonas selecionadas aleatoriamente. A pesagem do fruto ocorreu por meio de balança analítica, o comprimento e diâmetro máximo foram determinados com auxílio de craveira. Posteriormente, as azeitonas foram descaroçadas para a retirada dos endocarpos e através deles, realizar sua pesagem, medição do comprimento e do diâmetro máximo.

A polpa removida foi congelada e posteriormente liofilizada para proceder-se à determinação da atividade antioxidante.

3.3. Análise da atividade antioxidante dos frutos

A determinação da atividade antioxidante dos frutos foi efetuada a partir de extrações metanólicas. Posteriormente, a atividade antioxidante foi avaliada utilizando as metodologias DPPH, fenóis totais e poder redutor. Cada extração e análise foi feita em duplicado.

3.3.1. Extratos vegetais

A obtenção dos extratos deu-se a partir de 1,5 gramas de amostra liofilizada, na qual foi pesada em balança e colocada em gobelés de 150 mL e adicionado 50 mL de metanol como solução solvente, tal mistura foi submetida ao processo de agitação mecânica durante o período de 1 hora (figura 2). Após esse tempo, o extrato foi filtrado através de papel de filtro Whatman N°. 4 para um balão de fundo redondo de 250mL devidamente protegido com papel alumínio. Este procedimento foi repetido este mais duas vezes. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C num evaporador rotativo (Stuart RE 3000).



Figura 2 Processo de extração dos compostos antioxidantes

A determinação da massa do extrato foi obtida por meio do cálculo da diferença do peso final do balão com o peso inicial do mesmo, assim sendo adicionado metanol para se obter uma concentração de 100 mg de extrato/mL. A amostra foi armazenada em tubo de falcon de 15 mL (figura 3), com respectiva identificação em frigorífico.

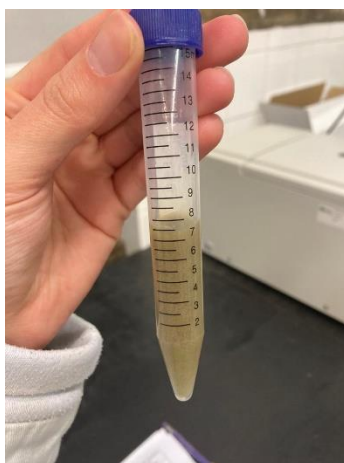


Figura 3 Amostra de extrato

3.3.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A análise da atividade antioxidante de extratos por meio da determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), foi executada levando em consideração a metodologia descrita por Hatano et al., (1988). Para tal, utilizou-se 300 μ L da amostra (para o branco foi usado 300 μ L de metanol) com 2,7 mL de solução de DPPH (2,4 mg de DPPH em 100mL de metanol), em tubos de ensaio e posteriormente foi realizada a agitação em vortex e deixados em escuro durante o período

de uma hora. A ação antioxidante dos extratos pode ser analisada por meio da mudança de cor da amostra que passa a ser amarelada, isso porque a solução DPPH apresenta cor roxa (Vicentino & Menezes, 2007). Ao fim desse período realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Genesys™ 10 UV) a 517nm. A percentagem de inibição foi calculada seguindo a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} * 100$$

a A_{DPPH} representa a absorvância da solução DPPH, ou seja, o branco, e A_A considera a absorvância da solução contendo o extrato.

3.3.3. Fenóis totais

A avaliação dos fenóis totais foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965). Para tal, misturou-se 1 mL da amostra (branco com metanol) com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e procedeu-se a agitação em vórtex, e deixou-se em repouso durante três minutos. Posteriormente, foi acrescentado 1 mL de Na_2CO_3 saturado com 7,5 mL de água destilada e realizada novamente a homogeneização da amostra e em seguida colocada no escuro pelo tempo de 1 hora e 30 minutos. Após esse período, as leituras foram feitas num espectrofotômetro ultravioleta (Genesys™ 10 UV) a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/mg de amostra.

3.3.4 Poder redutor

A determinação do poder redutor foi baseada na metodologia descrita por Berker et al., (2007). Nesse sentido, 1 mL da amostra foi incorporada com 2,5 mL de solução tampão com pH em 6,6 e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%, sendo incubada durante 20 minutos a uma temperatura de 50°C. Após arrefecimento, procedeu-se a adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% e agitação por meio de vortex. Posteriormente, foi recolhido 2,5 mL de sobrenadante e adicionado com 2,5 mL de água destilada juntamente com 0,5 mL de cloreto de ferro (III). Realizou-se a agitação em vortex e passado dois minutos, as leituras das absorvâncias foram executadas através do espectrofotômetro ultravioleta a 700 nm. Os resultados são apresentados em mg Trolox/g de amostra.

3.4. Avaliação da composição do azeite

3.4.1 Colheita das azeitonas

A colheita das azeitonas ocorreu no dia 30 de outubro. Para tal, foram colhidos, 2-3 kg de frutos, manualmente, para caixas perfuradas, devidamente identificadas de acordo com o tratamento correspondente em temperatura ambiente. As azeitonas foram colhidas no índice de maturação entre dois (MI 2) e três (MI 3), que foi determinado de acordo com as diretrizes do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2011).

O manuseio das mesmas era efetuado cuidadosamente para não ocasionar danos aos frutos.

3.4.2 Extração Abencor

A extração dos azeites de cada planta foi realizada conforme descrito por Rodrigues et al., (2020). Os frutos foram processados nas primeiras 24 horas após a colheita, numa planta piloto de extração com um analisador Abencor (Comercial Abengoa S.A., Sevilha, Espanha) com três unidades principais:

Moinho (moinho de martelo MM100 da MC2., Sevilha, Espanha; com um crivo de 5,5 mm de diâmetro e um motor monofásico de 1,5 kW);

Termobatedor (Thermo-Mixer TB-100 da MC2., Sevilha, Espanha; com 8 orifícios de trabalho e 8 painéis de mistura com regulação de temperatura e hélices individuais para misturar a pasta), onde a malaxação ocorre a temperatura controlada;

Centrífuga (Centrifugal Machine CF-100 da MC2., Sevilha, Espanha; com 1,5 kW motor trifásico, tambor inox que gira a 3500 rpm e timer automático).

As azeitonas foram moídas, a pasta foi homogeneizada e cerca de 700 g foram transferidos para a cada unidade da termobatedora para malaxação durante 30 minutos, utilizando banho-maria termostático a 25 °C. Após esse tempo, foi posteriormente centrifugada e decantada, e o azeite recolhido. Para cada amostra foram preparadas pelo menos quatro painéis, e após a extração, os azeites obtidos da mesma árvore foram misturados na mesma garrafa. Terminado o processo de extração os azeites foram preparados para análise e filtrados (Whatman paper nº 4) com sódio sulfato anidro para remover as partículas sólidas e água residual. Os azeites foram armazenados em frascos escuros de 100 mL e protegidos da exposição à luz em temperatura ambiente (20–25 °C).

3.4.3. Parâmetros de qualidade

A qualidade do azeite é realizada através da avaliação dos parâmetros físico-químicos. Com base nos resultados obtidos nas análises é possível classificar os azeites em três categorias comerciais nomeadamente azeite virgem extra, azeite virgem e azeite lampante que posteriormente tem de ser refinado para poder ser comercializado. Assim para podermos classificar os azeites devem ser determinado os seguintes parâmetros:

Acidez

A quantificação da acidez foi executada segundo o anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Foram pesadas 5 gramas de amostra de azeite em erlenmeyer e adicionado 50 mL de uma mistura de etanol 96%/éter dietílico (1:1) junto com 3 gotas de fenolftaleína, sendo este, o indicador de neutralização da solução. Posteriormente, realizou-se a titulação com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 N com agitação até que a amostra permanecesse com a cor laranja que deve permanecer durante pelo menos 10 segundos.

A acidez é expressa em percentagem de ácido oleico, sendo o cálculo realizado através da expressão:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{V * C * M}{10 * m}$$

Onde:

V- Corresponde ao volume de NaOH gasto na titulação;

C- Concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro (=0,1 N);

M- massa molar do ácido oleico em g/mol sendo 282,85;

m- o peso da amostra de estudo expressa em gramas;

Índice de Peróxidos

Para a determinação do índice de peróxidos utilizou-se como metodologia base descrita no anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Inicialmente foi necessário pesar 1,2 gramas da amostra em balão erlenmeyer, misturar com 10 mL de clorofórmio e 15 mL de ácido acético glacial, logo em seguida adicionou-se 1 mL de iodeto de potássio e realizou-se a vedação com parafilme procedendo a agitação durante 1 minuto e colocando posteriormente ao abrigo de luz por 5 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 75 mL de água destilada e 4 gotas de cozimento de amido (indicador) e efetuou-se a titulação com tiosulfato de sódio.

O resultado do índice de peróxidos foi expresso em mEq.O₂/Kg de azeite, sendo calculado pela expressão:

$$IP = \frac{V * N * 1000}{m}$$

Onde:

V - volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação levando em consideração o ensaio do branco;

N - corresponde a normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio sendo esta de 0,0152;

m – massa da amostra em gramas;

Coefficiente de extinção no ultravioleta

Esta análise foi feita de acordo com o anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Em tubos de falcon de 15 mL, pesou-se 0,6 gramas de amostra e com isoctano (2,2,4-trimetilpentano), preencheu-se até se completar 10 mL e foi executada homogeneização em vortex. Após efetuar as respectivas diluições, fez-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV–VIS(UV-1280 Shimadzu) a 232,264, 268 e 272 nm respectivamente.

Para os coeficientes de extinção a 232 nm, 268 nm e o valor de ΔK utilizou-se as fórmulas a seguir:

$$K_{232} = \frac{A_{232} * FD}{m * 10}$$

$$K_{268} = \frac{A_{268} * FD}{m * 10}$$

$$\Delta K = K_{268} - \left(\frac{K_{264} + K_{272}}{2} \right)$$

Em que:

A - corresponde a absorvância nos comprimentos de ondas;

FD - é o fator de diluição;

m - representa a massa da toma das respectivas amostras;

Análise sensorial descritiva

A análise sensorial foi realizada de acordo com o anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. Para tal recorreu-se a um painel treinado para a avaliação dos diferentes azeites. Nos azeites que não tinham

qualquer defeito sensorial, foi feita a análise do perfil como de acordo com a metodologia descrita pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) (COI/ T.20/ Doc. 22 de novembro de 2005) com algumas alterações descritas por Rodrigues et al., (2020). A prova foi feita numa sala apropriada, com luz natural, temperatura ambiente e isenta de odores. Para a realização da prova foram utilizados copos oficiais de prova estabelecidos pelo Conselho Oleícola Internacional (COI). Foi também disponibilizado aos provadores uma folha de registo, maçã cortada e água (para lavar a boca entre amostras) e cuspeiras. A avaliação foi feita com recurso a uma escala de 0 a 10 onde se avaliaram as sensações olfativas, das quais se incluem o frutado, as sensações de frutos e sensações herbáceas. Avaliou-se também as sensações gustativas sendo os sabores doces, amargos e picantes, além do frutado, sensações de fruto e sensações herbáceas.

3.4.5 Avaliação da estabilidade oxidativa

Para avaliar a estabilidade oxidativa foi seguida a metodologia descrita por Veloso et al., (2020). Para o teste de estabilidade oxidativa foi utilizado o Rancimat 743 (Methom Ltd., Suíça), um equipamento que realiza as análises automaticamente e de forma contínua. Esta metodologia consiste em borbulhar correntes de ar, filtrada, limpa e seca a uma velocidade de 20 L/h através da amostra aquecida a $120 \pm 1,6^\circ\text{C}$. Foram pesados 3,00 gramas por amostra, sendo esta análise feita em duplicado. Os compostos de oxidação que são formados ao longo do armazenamento são mais polares que os triglicéridos, logo são arrastados pelo fluxo de ar que os depositam na solução aquosa. A análise é finalizada quando cada amostra atinge a condutividade de $300\mu\text{S}/\text{cm}$. O tempo de estabilidade é calculado pelo programa informático associado ao equipamento, a partir dos cálculos das tangentes à curva obtida pela análise.



Figura 4 Equipamento Rancimat

3.4.6. Atividade antioxidante dos azeites

A quantificação da atividade antioxidante dos azeites aconteceu através dos métodos DPPH, fenóis totais e ABTS, sendo realizados posteriormente a preparação das amostras.

3.4.6.1. Extração das amostras de azeites

Para posteriores análises foi necessário realizar a preparação das amostras, para isso, utilizou-se como base a metodologia descrita por (Pizarro et al., 2013) com algumas modificações. Nesse sentido, em tubos de falcon utilizou-se 0,5 gramas de amostra com 3 mL de metanol-água na proporção de 80:20 e foi realizada agitação em vortex. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos. Passado esse período, retirou-se o sobrenadante e em novos tubos, completou-se com a solução de metanol-água (80:20) até a marca de 5 mL. As amostras foram embaladas com papel alumínio e acomodadas em frigorífico.

3.4.6.2. Determinação do efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada seguindo a metodologia descrita por Pizarro et al., (2013) com alguns ajustes nas quantidades utilizadas.

Desse modo, 300 μ L da amostra foi misturada com 3,5 mL da solução DPPH, agitada em vortex, armazenada ao escuro durante 30 minutos. Após o período, fez-se a

leitura das absorvâncias em espectrofotômetro UV–VIS/UV-1280 Shimadzu com comprimento de onda de 517 nm. A percentagem de inibição foi calculada pela equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} * 100$$

Em que:

A_{DPPH} - é a absorvância da solução DPPH, ou seja, o branco;

A_A - a absorvância da solução contendo o extrato;

3.4.6.3. Fenóis totais

Uma alíquota de 100 µL da amostra foi incorporada com 1500 µL de água destilada e 100 µL Folin-Ciocalteu, realizou-se a agitação e repouso durante 3 minutos. Em seguida, 300 µL de carbonato de sódio 20% (Na_2CO_3) foi adicionado e novamente as amostras foram submetidas a agitação em vortex. Durante 60 minutos permaneceram armazenadas ao abrigo de luz e em espectrofotômetro UV–VIS/UV-1280 Shimadzu foi efetuada as leituras das absorvâncias a 765 nm. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico/kg de azeite.

3.4.6.4. Atividade Sequestradora do Radical ABTS

Para a execução desta análise, utilizou como base a metodologia de Re et al., (1999), em que consistiu de primeiro momento realizar a solução de ABTS, da qual foi utilizada uma quantidade de 25 mL e incorporada com 0,44 mL de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Posteriormente, efetuou-se a agitação e o armazenamento da mesma em abrigo de luz por um período aproximado de 16 horas. Dado esse período efetuou-se a dissolução da mistura já preparada em etanol absoluto até atingir absorvância de $0,700 \pm 0,020$ em 734 nm. Diante disso, utilizou-se 100µL da amostra e 2 mL da solução preparada, realizou-se agitação e repouso durante 6 minutos. Após esse tempo, efetuou-se as leituras em espectrofotômetro (Genesys™ 10 UV) à 734 nm.

3.5. Análise estatística

Aplicou-se a análise de variância one-way (one-way ANOVA) para avaliar a existência de efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,001$) dos efeitos bioestimulantes na biometria e atividade antioxidante dos frutos assim como influencia nos azeites monovarietais da cv. Cobrançosa nomeadamente na qualidade (acidez, índice

de peróxidos e coeficientes de extinção) e atividade oxidantes (DPPH e fenóis totais). As possíveis influências dos biostimulantes no comportamento dos azeites, quanto as suas características sensoriais e físico-químicas, foram avaliadas usando a análise de componentes principais (PCA-Biplot). As análises estatísticas procederam-se no software livre RStudio (versão 3.6.2).

CAPÍTULO IV

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Biometria dos frutos e endocarpo

A avaliação biométrica foi efetuada a fim de verificar os efeitos da aplicação de bioestimulantes na morfologia dos frutos e respectivos endocarpos em relação aos parâmetros peso, diâmetro e comprimento nos diferentes tratamentos. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1- Valores médios, \pm desvio padrão, valores mínimos e máximos da biometria dos frutos e endocarpos

| | Tratamento | Peso (g) | Diâmetro (mm) | Comprimento (mm) |
|-----------|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Fruto | Controlo | 2,24 \pm 0,71b (0,97-3,92) | 14,53 \pm 1,39b (11,56-17,9) | 17,63 \pm 2,18b (12,85-22,26) |
| | T1 | 2,10 \pm 0,83b (0,88-3,74) | 14,2 \pm 1,61b (11,02-17,38) | 17,04 \pm 2,86b (12,08-21,87) |
| | T2 | 2,05 \pm 0,63b (0,95-3,65) | 14,04 \pm 1,37b (11,5-16,92) | 17,25 \pm 2,16 b (12,09-22,21) |
| | T3 | 2,81 \pm 0,62a (1,27-4,29) | 15,62 \pm 1,14a (12,65-18,31) | 19,8 \pm 1,81a (14,65-23,24) |
| | T4 | 2,40 \pm 1,03b (0,82-4,63) | 14,7 \pm 2,05b (10,99-18,9) | 18,04 \pm 3,02b (12,09-23,7) |
| | Valor de P | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Endocarpo | Controlo | 0,37 \pm 0,12b (0,16-0,70) | 6,99 \pm 0,77ab (4,94-8,76) | 12,27 \pm 1,74b (8,56-15,47) |
| | T1 | 0,35 \pm 0,15b (0,13-0,66) | 6,79 \pm 0,89b (5,09-9,18) | 11,93 \pm 2,30b (8,58-15,86) |
| | T2 | 0,36 \pm 0,11b (0,18-0,63) | 6,80 \pm 0,73b (5,09-8,23) | 12,08 \pm 1,7b (7,73-15,66) |
| | T3 | 0,46 \pm 0,11a (0,18-0,79) | 7,37 \pm 0,62a (5,26-8,69) | 13,68 \pm 1,27a (10,11-15,96) |
| | T4 | 0,39 \pm 0,15b (0,15-0,71) | 7,03 \pm 0,96ab (5,41-8,94) | 12,42 \pm 2,13b (8,25-16,55) |
| | Valor de P | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

Em relação ao fruto foi possível verificar diferenças significativas ($P < 0,001$), onde o tratamento 3 foi aquele que apresentou maiores valores nos três parâmetros avaliados, sendo que os valores médios obtidos ao nível do peso, foi de 2,81 gramas, para o diâmetro 15,62 mm e 19,8 mm para o comprimento. Comparativamente aos restantes tratamentos, o peso do fruto teve variação média de 2,05 a 2,81 gramas, o diâmetro apresentou valores de 14,04 a 15,62 mm e em relação ao comprimento a variação foi de 17,04 à 19,80 mm.

Por outro lado, ao nível do endocarpo, a variação média dos parâmetros biométricos para os tratamentos foi de 0,35 a 0,46 gramas (peso), 6,79 a 7,37 (diâmetro) e 11,93 a 13,68 mm (comprimento). Verificou-se diferenças estatísticas significativas ($P < 0,001$) em que o tratamento 3 obteve os maiores valores médios nos três parâmetros em questão.

Os resultados obtidos diante desta análise diferenciam-se dos resultados obtidos por (Hernández-Hernandez et al., 2019), que testaram alguns tratamentos com a aplicação de diferentes bioestimulantes, incluindo à base de extratos de algas em oliveiras das cultivares Arbequina e Koroneiki. Os melhores resultados a nível do peso dos frutos foram obtidos através do tratamento com adubação potássica e bioestimulante à base de aminoácidos, em que para a cultivar Arbequina o peso médio foi de 1,30 e 1,38 gramas e para Koroneiki foi de 0,75 e 0,80 gramas.

Nota-se que o tratamento 3 obteve os maiores valores nos parâmetros analisados tanto a nível de fruto quanto endocarpo. Tais resultados diferem do encontrado por Oliari et al., (2013) quando testaram os bioestimulantes à base de extratos de algas *Ascophyllum nodosum* e *Ecklonia maxima* em ameixeiras da cv. Pluma, onde verificaram que ao nível do diâmetro dos frutos não houve influências significativas diante dos tratamentos.

4.2. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos frutos foi efetuada com o intuito de verificar se os bioestimulantes proporcionaram algum efeito na atividade biológica dos frutos da cv. Cobrançosa. Para medir a atividade antioxidante, foram feitas várias determinações nomeadamente:

4.2.1 Análise DPPH

A determinação da atividade antioxidante através da metodologia do efeito bloqueador de radicais livres DPPH é muito utilizada. Seu valor é expresso em porcentagem de inibição de DPPH. Diante dos resultados obtidos (figura 5), verificou-se diferenças significativas entres os tratamentos, podendo ser perceptível que nos tratamentos com aplicação de bioestimulantes, a capacidade de bloquear o radical DPPH não foi tão grande.

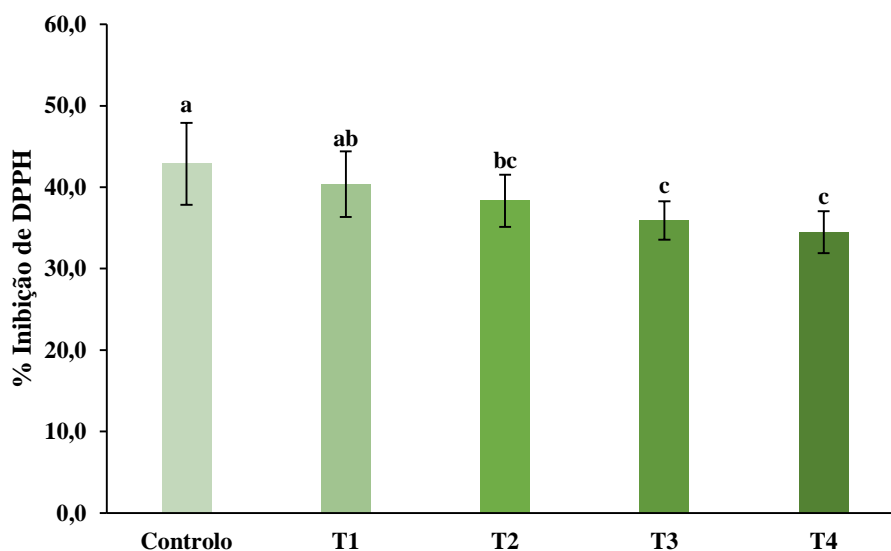


Figura 5 Valores médios da percentagem de inibição de DPPH dos extratos de azeitonas expresso em % de inibição DPPH. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas.

O controlo foi aquele que apresentou maior capacidade antioxidante em comparação aos restantes tratamentos, apresentando uma taxa de inibição de 42,86%. A percentagem de inibição do tratamento 1 foi de 40,37% e para o tratamento 2 foi de 38,33%, sem diferença estatística entre si. O tratamento 3 obteve 35,92% de inibição e no tratamento 4 foi de 34,48%. Nota-se que estes não diferiram estatisticamente entre si, ambos apresentaram as menores taxas de inibição ao radical DPPH. Tais resultados são oposto ao encontrado por Cirillo et al. (2022) que avaliaram os efeitos da aplicação de bioestimulantes à base de extratos de plantas tropicais, de glicina betaína e de *Trichoderma* em oliveiras da cultivar Racioppella e verificaram que a atividade antioxidante de extratos de drupas da azeitona pelo método DPPH aumentou para todos os tratamentos, com destaque para o tratamento com aplicação de produto à base de *Trichoderma* que obteve aumento de 42,23%.

4.2.2 Fenóis totais

Fenóis totais é uma metodologia empregada na avaliação da capacidade antioxidante de uma determinada amostra, na qual os seus resultados são expressos em mg de ácido gálico por grama de amostra.

Os resultados obtidos (figura 6) mostraram que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que os valores médios variaram entre 38,68 mg ácido gálico/g de amostra (controlo) à 37,12 mg ácido gálico/g de amostra (tratamento 4).

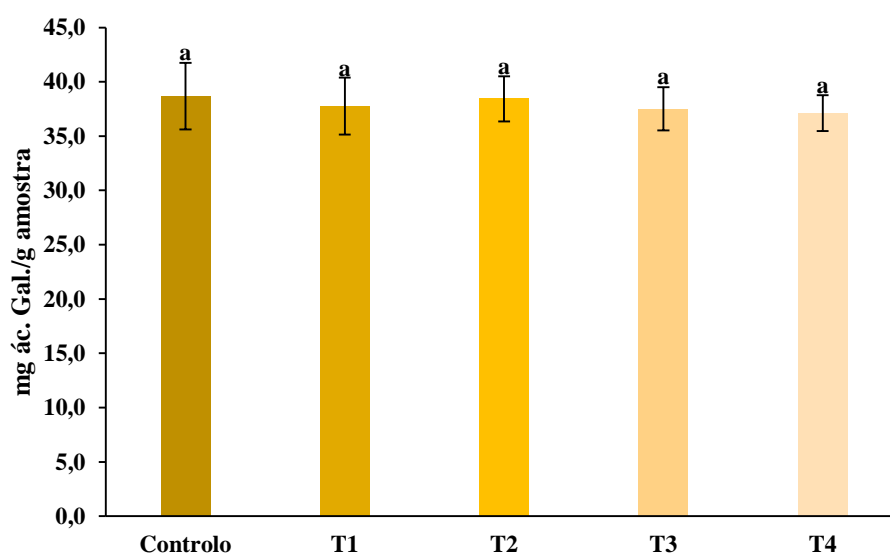


Figura 6 Valores médios do teor de fenóis totais em extratos de azeitonas expressos em mg ácido gálico/grama de amostra. Letras minúsculas iguais significam que não houve diferenças estatísticas significativas.

4.2.3 Poder redutor

Através da metodologia do poder redutor, foi possível determinar a atividade antioxidante dos extratos das azeitonas.

Estatisticamente foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os tratamentos, sendo que os maiores valores foram verificados no Controlo, com 123,66 mg Trolox/grama de amostra e no tratamento 1, com 121,31 mg Trolox/grama de amostra. O menor valor foi observado no tratamento 4, com 104,64 mg Trolox/grama de amostra, o qual diferiu estatisticamente dos tratamentos Controlo e T1 (Figura 7).

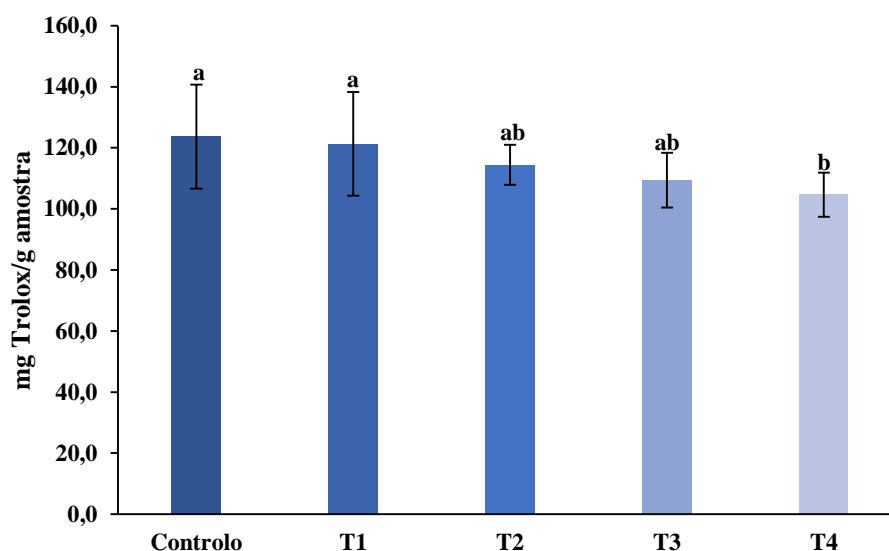


Figura 7 Valores médios do ensaio do poder redutor expressos em mg Trolox/grama de amostra. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

4.3. Determinação da qualidade dos azeites

4.3.1 Parâmetros de qualidade

A qualidade de um azeite é determinada por meio de alguns parâmetros, como a acidez livre, índice de peróxidos, espectrofotometria no ultravioleta (K_{232} e K_{268}) e análise sensorial. Tais parâmetros possibilitam classificar o azeite em determinada categoria. O Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022 atribui valores máximos a esses parâmetros. De tal modo, para ser considerado um azeite virgem extra, este deve apresentar uma acidez $\leq 0,80$, índice de peróxidos $\leq 20,0$ mEqO₂/Kg, espectrofotometria no ultravioleta (K_{268}) $\leq 0,22$ e espectrofotometria no ultravioleta (K_{232}) $\leq 2,50$. Quando se obtêm valores maiores a estes índices estabelecidos, o azeite pode se enquadrar na categoria de azeite virgem ou lampante. Diante do exposto, os resultados obtidos na determinação da qualidade dos azeites extraídos de oliveiras tratadas com diferentes bioestimulantes através dos parâmetros já mencionados, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores médios, \pm desvios padrões, valores mínimos e máximos dos parâmetros de qualidade.

| Parâmetros de qualidade | Tratamento | | | | | Valor de P |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------|
| | Controlo | T1 | T2 | T3 | T4 | |
| Acidez (% Ácido oleico) | 0,37 \pm 0,03ab (0,34-0,39) | 0,36 \pm 0,03abc (0,34-0,39) | 0,31 \pm 0,05c (0,23-0,34) | 0,33 \pm 0,04bc (0,28-0,39) | 0,39 \pm 0,02a (0,34-0,39) | 0,001 |
| IP (mEq.O ₂ /Kg de azeite) | 1,26 \pm 0,004a (1,26-1,27) | 1,26 \pm 0,003a (1,25-1,26) | 1,26 \pm 0,002a (1,26-1,27) | 1,26 \pm 0,004a (1,26-1,27) | 1,26 \pm 0,001a (1,25-1,26) | 0,321 |
| K₂₃₂ | 1,79 \pm 0,10a (1,61-1,93) | 1,96 \pm 0,13a (1,75-2,10) | 1,52 \pm 0,20b (1,26-1,77) | 1,76 \pm 0,18a (1,55-2,09) | 1,94 \pm 0,10a (1,85-2,12) | 0,001 |
| K₂₆₈ | 0,18 \pm 0,01ab (0,16-0,20) | 0,18 \pm 0,01ab (0,17-0,20) | 0,13 \pm 0,02c (0,09-0,16) | 0,17 \pm 0,02b (0,13-0,19) | 0,20 \pm 0,009a (0,19-0,22) | 0,001 |
| Classificação comercial | AVE | AVE | AVE | AVE | AVE | |

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam diferenças estatísticas significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey; AVE = Azeite Virgem Extra).

Em relação a acidez, nota-se que houve diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os tratamentos, com uma variação média de 0,31 a 0,39% de ácido oleico. O tratamento 2 apresentou o menor índice de acidez, variando de 0,23 a 0,34% de ácido oleico. O contrário foi observado no tratamento 4, em que o nível médio de acidez foi superior ao tratamento 2 e tratamento 3, com valor de 0,39% de ácido oleico. Num estudo realizado por Chouliaras et al. 2009, os autores perceberam que a acidez dos azeites da cultivar Koroneiki foi menor nos tratamentos em que houve aplicação adicional de extratos de algas *Ascophyllum nodosum* L. Por outro lado, os autores Leogrande et al., (2022) quando avaliaram os possíveis efeitos da aplicação foliar de um extrato à base de vegetais e algas marrons (*Ascophyllum nodosum* (L.) na oliveira cultivar Leccino, verificaram que a acidez do azeite foi maior no controlo (0,23%) do que no tratamento com bioestimulante (0,21%). O índice de acidez está estritamente relacionado com a acidez final do azeite, de modo que a qualidade será melhor se a acidez for baixa (Silva et al., 2012).

Os peróxidos são gerados através da oxidação de óleos e gorduras em consequência da ação do oxigénio sendo que através do índice de peróxidos é possível quantificar o estado de oxidação dos óleos e gorduras (Scherer & Böckel, 2018), visto que a proporção em que os ácidos gordos insaturados e livres tendem a reagir com o oxigénio, ocasionando aumento nos parâmetros de qualidade em questão (Filoda et al., 2021). No que diz respeito ao índice de peróxidos, os níveis variaram de 1,25 a 1,27 mEq.O₂/Kg de azeite. Para o controlo e todos os tratamentos, a média permaneceu 1,26 mEq.O₂/Kg de azeite, não sendo encontradas diferenças significativas ($P > 0,001$). Estes resultados são diferentes dos encontrados por Chouliaras et al. 2009, que verificaram que o índice de peróxido nos azeites da cultivar Koroneiki teve aumento em todos os tratamentos, incluindo aqueles que receberam aplicação extra de extrato de algas, apresentando variação de 13,5 à 20,8 mEq.O₂/Kg.

No coeficiente de extinção K_{232} verificou-se diferenças significativas ($P < 0,001$) em que o tratamento 2 apresentou os menores índices sendo estes, 1,26-1,77. Nos restantes tratamentos, não foram observadas diferenças estatísticas. Os valores médios para K_{232} permaneceram entre 1,52 a 1,96. De acordo com Silva & Schmiele, 2021, o coeficiente de extinção específico também chamado de absorção no ultravioleta em 232 e 270nm também é um meio para indicar a qualidade do azeite.

Por outro lado, a absorbância ultravioleta quantificada no comprimento de onda de K_{268} variou entre os tratamentos, sendo possível observar diferenças significativas ($P < 0,001$), de tal modo que o tratamento 4 obteve o maior valor, variando de 0,19 a 0,22.

O menor valor foi verificado no tratamento 2, com 0,09 a 0,16. Os valores obtidos tanto em K_{232} e K_{268} se diferenciam dos resultados obtidos por Cirilo et al. (2022) quando testaram bioestimulantes à base de extratos de plantas tropicais, de produtos à base de glicina betaína e de *Trichoderma*, sendo que para K_{232} os valores variaram de 1,30 (tratamento com glicina betaína) à 1,76 (tratamento com *Trichoderma*) e K_{270} apresentou variação de 0,17 (tratamento com extrato de plantas tropicais e glicina betaína) à 0,25 (tratamento com *Trichoderma*).

Os resultados obtidos através dos parâmetros de qualidade (acidez, índice de peróxidos, K_{232} e K_{270}) permitem classificar os azeites como virgem extra, pois os valores apresentados estão em acordo com o estabelecido para esta categoria segundo o Regulamento de Execução (UE) 2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022.

4.3.2 Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é fator determinante para a qualidade dos óleos vegetais (Castelo-Branco & Torres, 2011). Atráves da estabilidade oxidativa é possível estimar o tempo de vida de um azeite. Os resultados (figura 8) evidenciam que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,001$).

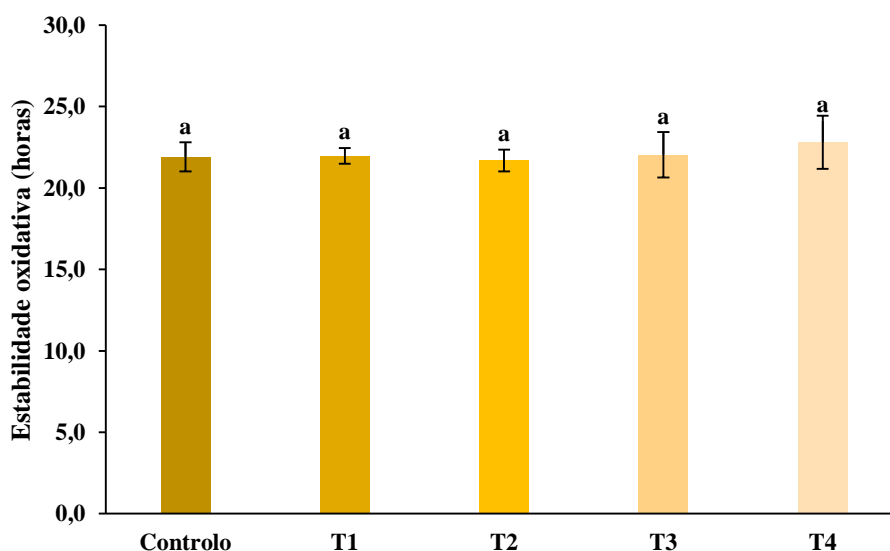


Figura 8 Estabilidade oxidativa dos azeites extraídos de azeitonas tratadas com diferentes bioestimulantes.

A estabilidade oxidativa dos diferentes tratamentos atingiu uma variação média de 22,80 horas a 21,68 horas.

4.3.3 Atividade antioxidante dos azeites

A determinação da capacidade antioxidante dos azeites foi realizada por meio dos ensaios de DPPH, ABTS^{•+} e fenóis totais.

Segundo (Oliveira et al., 2009) o método DPPH é o mais empregado, no qual é baseado em analisar a atividade sequestradora do radical DPPH, apresentando cor púrpura, no qual absorve através do comprimento de onda de 517 nm. Os resultados obtidos por meio do efeito bloqueador do radical livre DPPH, possibilitaram verificar diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os tratamentos. A maior taxa de inibição pode ser visualizada no tratamento 4, com 67,63 %. Por outro lado, o tratamento 2 obteve 52,76 % de inibição de DPPH, sendo essa a menor taxa.

O contrário foi observado nos resultados diante do método ABTS^{•+}, em que também ocorreram diferenças significativas ($P < 0,001$), no entanto, o Controle foi aquele que apresentou maior taxa de inibição frente ao radical ABTS^{•+}, com uma percentagem de inibição de 47,28 %. A menor percentagem de inibição foi verificada no tratamento 2, sendo esta de 40,96%. Os resultados da atividade antioxidante por meio do ensaio DPPH e ABTS estão apresentados na figura 9.

A atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS^{•+} foi avaliada por Brito et al., (2018) quando avaliaram a influência de caulim (KL) e ácido salicílico (SA) na capacidade antioxidante de azeites da cv. Cobrançosa em dois períodos 2015 e 2016, que verificaram que esses dois produtos colaboraram para uma maior capacidade antioxidante no ano de 2015 para ambos os métodos (DPPH e ABTS), já no ano de 2016, os maiores valores foram obtidos no Controle, nos respectivos métodos.

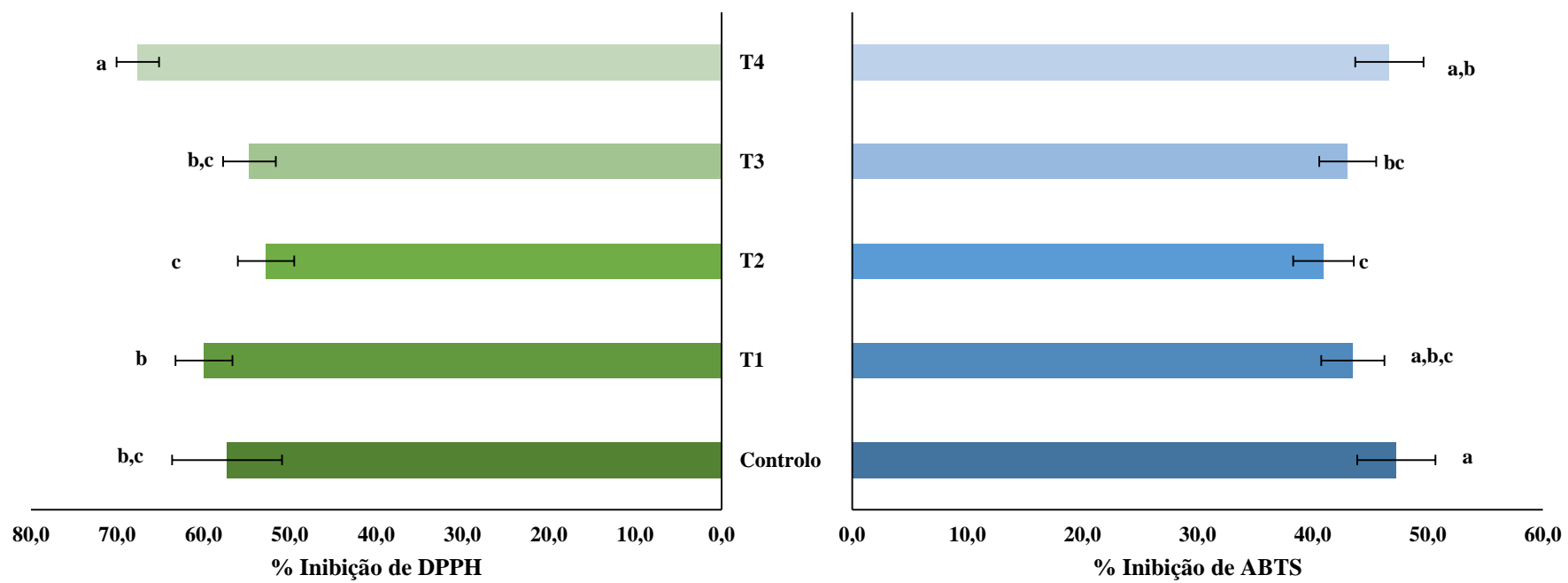


Figura 9 Valores médios de atividade antioxidante dos azeites avaliadas pelos métodos de DPPH e ABTS.

Nos azeites, os compostos fenólicos são considerados antioxidantes naturais (Rodríguez-Méndez et al., 2008) e sua quantificação pode ser efetuada através do método de *Folin-Ciocalteu*. É um método que reside na transferência de um elétron, podendo dessa maneira, mensurar a capacidade redutora da substância antioxidante em questão (Vieira et al., 2015). Nesse sentido, a figura 10 apresenta os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante pelo método de fenóis totais.

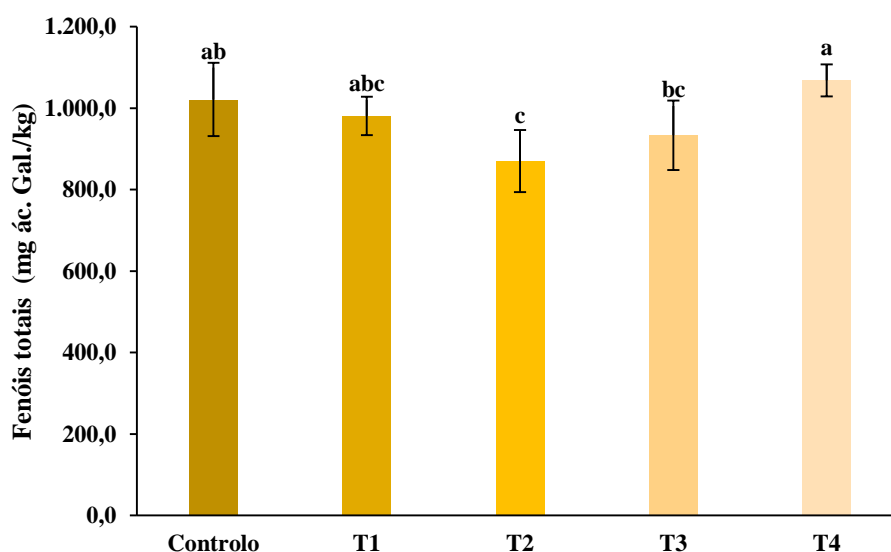


Figura 10 Fenóis totais em azeites

Observou-se uma variação significativa ($P < 0,001$) entre os tratamentos, no qual o tratamento 4 obteve 1068,24 mg de ácido gálico/Kg de azeite, o maior valor médio entre os tratamentos, diferindo dos tratamentos T2 e T3, mas não do Controlo. Diferentemente, o tratamento 2, apresentou o menor valor de fenóis totais, sendo 870,39 mg de ácido gálico/Kg de azeite, diferindo do Controlo e T4. Os valores encontrados diferem um pouco dos valores obtidos por Leogrande et al., (2022), no qual observaram que o teor de polifenóis totais aumentou consideravelmente quando avaliaram o efeito da aplicação de *Ascophyllum nodosum* em oliveiras cv. Leccino, cujos valores obtidos foram de 181 mg mg de ácido gálico/Kg (tratamento com bioestimulante) à 50,50 mg de ácido gálico/Kg (controlo). Por outro lado, Tasioula-Margari et al., (2011) ao avaliar dois bioestimulantes à base de *Ascophyllum nodosum* e um produto à base de nitrogênio orgânico em oliveiras da cultivar ‘Mastoidis’, verificaram que o teor de fenóis totais foi reduzido de maneira significativa nos tratamentos com produtos à base de *Ascophyllum nodosum* e aumentado no tratamento com produto à base de nitrogênio orgânico.

Ao analisar os três métodos (DPPH, ABTS e fenóis totais), percebe-se que o tratamento 2 se comportou de maneira semelhante para os mesmos, apresentando a menor atividade antioxidante. Os ensaios DPPH e fenóis totais se relacionam, pois mostram que a maior atividade antioxidante foi verificada no tratamento 4.

4.3.4 Análise sensorial dos azeites

Os boxplots (figura 11) apresentam às sensações olfativas dos azeites caracterizadas por meio da análise sensorial, da qual foram avaliadas em uma escala de 0 a 10. Quanto ao frutado verde verificou-se uma variação de 5,4 à 7,6, sendo a maior intensidade presente no Controlo e a menor nos tratamentos 2 e 4, com diferenças significativas entre os tratamentos. As sensações de frutado verde também foram encontradas por Rodrigues et al., (2020), ao avaliarem o perfil sensorial descritivo de oliveiras centenárias. Sobre as sensações de frutos, apenas se observou a presença de maçã, tomate e frutos secos. Para maçã, o tratamento 1 demonstrou maior intensidade (5,4) enquanto o tratamento 2 a menor, sendo de 2,8. Já em relação ao tomate, verificaram-se diferenças significativas, sendo que a maior intensidade esteve presente no controlo (6,3) e a menor no tratamento 4 (3,5). Por outro lado, na sensação de frutos secos, as maiores predominâncias são observadas no controlo (4,0), no tratamento 3 (3,8) e no tratamento 1 (3,5) e as menores no tratamento 4 (2,4) e tratamento 2 (2,3). Nas sensações olfativas, verificou-se a presença de atributos herbáceos, como rama de tomateiro, erva fresca e couve. A sensação de rama de tomateiro teve maior intensidade no controlo, com um valor de 6,4, sendo este considerado de maior intensidade. O tratamento 4 apresentou a menor intensidade, com um valor de 3,0. Estatisticamente existe diferenças significativas entre os tratamentos. A presença de erva fresca representou uma variação mediana de 2,3 a 5,1, sendo a maior intensidade verificada no tratamento 1 e a menor no tratamento 2. Em relação a sensação de couve, houveram diferenças significativas, onde o tratamento 1 representou a menor intensidade (3,6). As maiores intensidades foram verificadas no controlo (5,3), no tratamento 4 (4,9), seguido do tratamento 3 (4,8) e tratamento 2 (4,7) respetivamente. A harmonia é descrita como uma sensação global da qual une todas as percepções adquiridas pelo provador, possibilitando apontar o equilíbrio existente entre as percepções encontradas (Rodrigues et al., 2020). Quanto a harmonia, não houveram diferenças significativas, sendo que o valor médio permaneceu entre 7,7 a 8,1. Valor próximo a estes foi encontrado por Lamas et al., (2021) em azeites monovarietais da cv. Cobrançosa, sendo uma média de 7,2 para esta sensação.

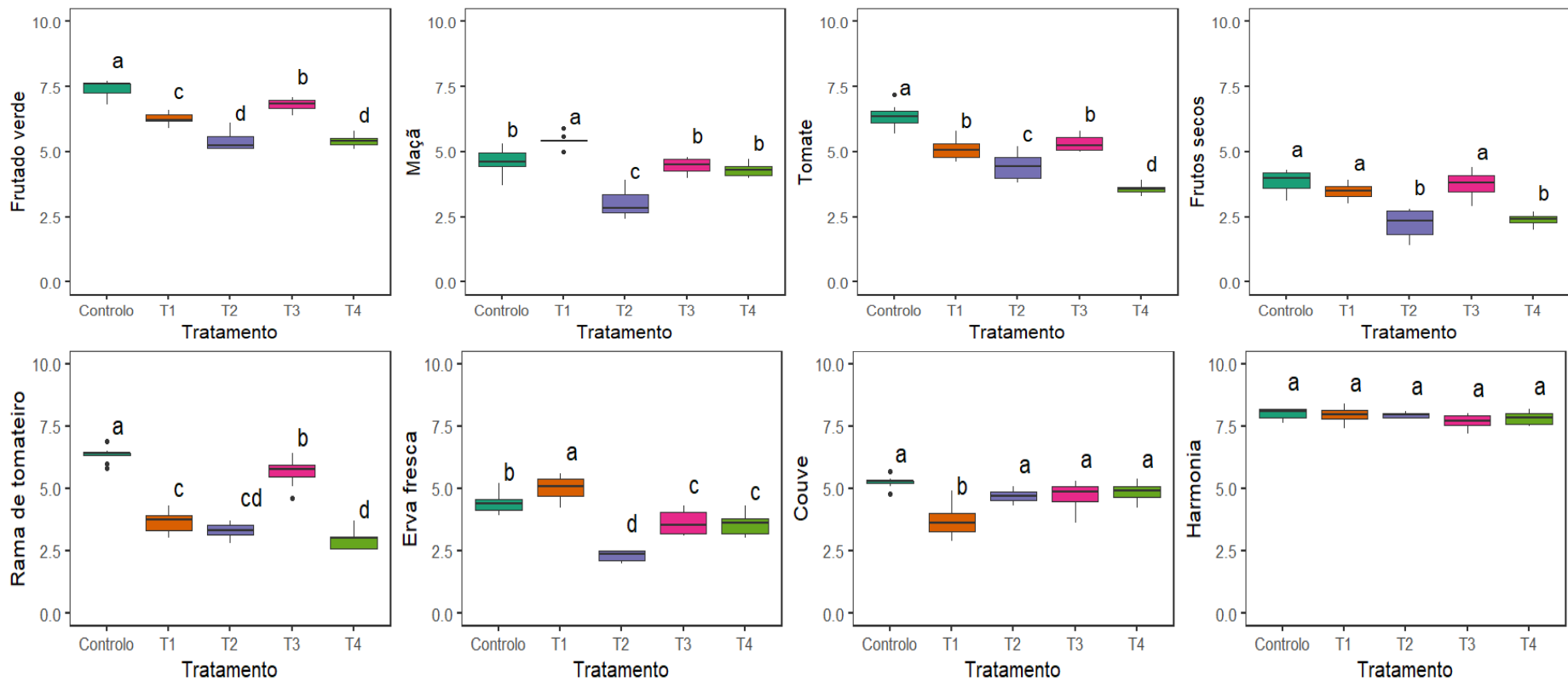


Figura 11 Boxplots relativo as sensações olfativas dos azeites. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey).

Na determinação do perfil sensorial através das sensações gustativas (figura 12), observa-se maior predominância da sensação de frutado verde no controlo, em que o valor é de 7,4. O tratamento 4 apresentou a menor intensidade com valor de 4,9. Os resultados estão representados na figura 12. Em relação a percepção de frutas, a sensação de maçã variou de 5,4 a 3,1, sendo que a maior intensidade está presente no controlo e a menor intensidade no tratamento 2. Para o tomate, observou-se diferenças significativas sendo que o controlo apresentou a maior intensidade, com 7,1. As menores intensidades foram verificadas nos tratamentos 2 e 4. Na sensação de frutos secos, verificou-se que sua intensidade apresentou uma variação de 2,0 a 4,6. A maior predominância foi observada no controlo, enquanto a menor foi observada no tratamento 2. Sensações gustativas de frutos secos também foram encontradas por Lamas et al., (2021) em azeites monovarietais da cv. Cobrançosa. No que diz respeito as sensações herbáceas, foi verificada a presença de rama de tomateiro, erva fresca, couve e folha de oliveira. Na sensação de rama de tomateiro, os tratamentos se diferenciaram estatisticamente. O tratamento 3 apresentou valor de 6,4 e o controlo de 6,0, ambos representaram as maiores intensidades, sendo diferentes dos demais, sendo que as menores intensidades estiveram presentes no tratamento 2, com valor de 3,9 e no tratamento 4, com de 3,1. Na sensação de erva fresca verificou-se diferenças significativas, com uma variação de 2,3 a 4,5. A maior intensidade foi observada no controlo e a menor no tratamento 1. Com relação à sensação de couve, esta está presente em maior intensidade no tratamento 2 (5,8) e no controlo (5,5), sem diferença estatística entre si. O tratamento 1 obteve a menor intensidade, sendo o valor de 3,7. Já no atributo de folhas de oliveira, foram observadas diferenças significativas, onde a maior intensidade foi visualizada no controlo, obtendo valor de 7,6 e a menor predominância ocorreu no tratamento 1 com 3,2.

Na sensação de harmonia, houve uma variação de 7,9 a 7,4, sendo que a maior intensidade deste atributo foi verificada no controlo, apresentando valor de 7,9. Por outro lado, os menores valores foram observados nos tratamentos 4, 1 e 2, ambos não se diferiram entre si.

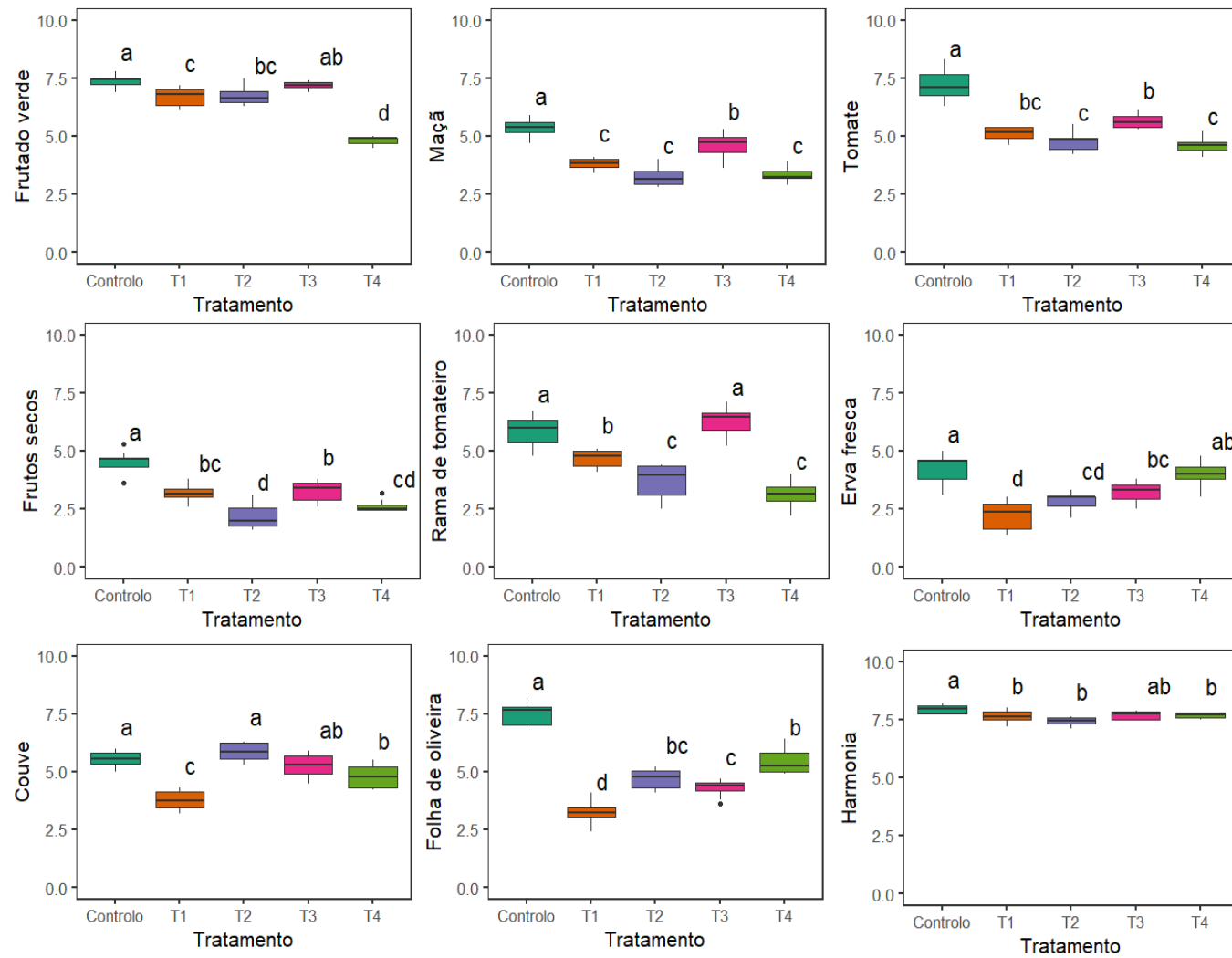


Figura 12 Boxplots das sensações gustativas dos azeites. Letras minúsculas indicam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey)

No que diz respeito as sensações de doce, amargo e picante, verificou-se uma variação nos diferentes tratamentos (figura 13). Relativamente à sensação de doce, o tratamento 4 foi o que demonstrou a maior intensidade com 1,6, diferente do tratamento 3 que apresentou o valor de 1,2 e do tratamento 2, com 1,0, sem diferenças significativas entre si e que, resultaram nas menores intensidades. Na sensação de amargo, verificou-se variação de 5,5 a 6,5 sendo que o controlo apresentou a maior predominância deste atributo e o tratamento 4 a menor intensidade. Em relação ao picante, a intensidade variou de 5,0 a 6,3. O controlo, bem como os tratamentos 3 e 2 não se diferenciaram estatisticamente entre si, sendo o maior valor verificado no controlo. O tratamento 4 obteve 5,0, a menor intensidade e o tratamento 1 apresentou 5,4 sem diferenças significativas entre si.

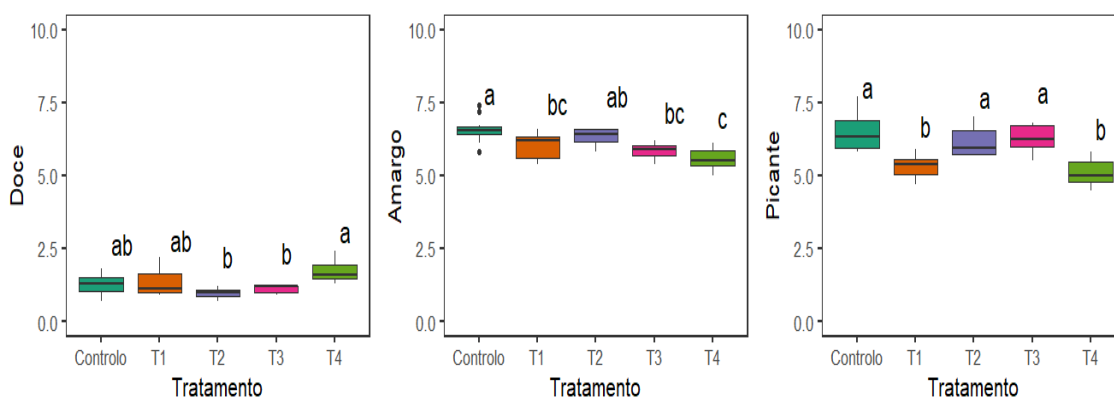


Figura 13 Boxplots das sensações gustativas doce, amargo e picante dos azeites. Letras diferentes representam diferenças significativas em um nível de significância de 5% (ANOVA seguida pelo teste multicomparação de Tukey)

A complexidade está relacionada com a quantidade de sensações percebidas, de modo que quanto maior essa quantia, maior é a complexidade. Por outro lado, a persistência diz a respeito do tempo que as sensações percebidas permanecem na boca, sendo um maior tempo, mais elevada é essa persistência (Rodrigues et al., 2020). Em relação a complexidade os valores obtidos variaram de 6,4 a 7,3, sendo o maior valor atribuído ao tratamento 4 e os menores aos tratamentos 1 e 2 respectivamente. Por outro lado, a persistência variou de 8,1(tratamento 3) à 7,6 (tratamento 1).

De um modo geral, percebe-se que a aplicação dos bioestimulantes nas oliveiras cv. Cobrançosa colaboraram para a formação de azeites com sensação mais amarga e picante. Proporcionaram também menor percepção de frutado verde e outros atributos como é o exemplo da maçã, tomate, frutos secos. Nas sensações herbáceas, a sensação de

couve foi aquela que se manteve mais estável com a aplicação de bioestimulantes. Contudo, mesmo havendo diferenças significativas entre as sensações percebidas, na harmonia, todos os azeites apresentam valores semelhantes, não sendo observadas diferenças significativas para este parâmetros nas sensações olfativas.

4.3.5 Análise de Componentes Principais (PCA)

A figura 14 apresenta os resultados na análise dos componentes principais das sensações olfativas e gustativas obtidas mediante a realização da análise sensorial dos azeites extraídos de oliveiras cv. Cobrançosa tratadas com diferentes bioestimulantes. A variação total foi de 56,8%.

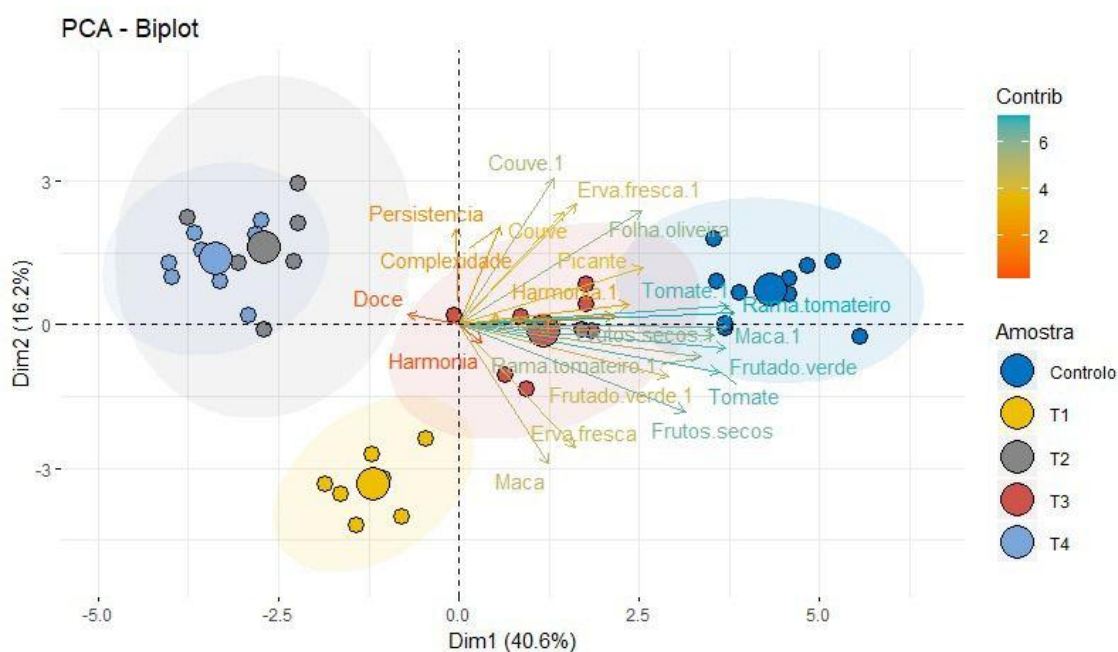


Figura 14 Diferenciação das sensações olfativas e gustativas dos azeites extraídos de oliveiras cv. Cobrançosa tratadas com diferentes bioestimulantes: PCA – Biplot com base na análise sensorial.

Percebe-se uma diferenciação entre os azeites dos tratamentos, nos quais os tratamentos 2 e 4 apresentaram sensação mais adocicada. Em contrapartida, os azeites do controlo e do tratamento 3 apresentaram semelhanças nas sensações olfativas herbáceas como folha de oliveira e rama de tomateiro, mas também em frutado verde. Já para as sensações gustativas apresentaram semelhanças na percepção de frutos como maçã, tomate e frutos secos. Eles também se assemelham, pois, apresentam sensação gustativa picante.

CAPÍTULO V

Conclusão

5. Conclusão

Através do presente trabalho avaliou-se a influência de diferentes bioestimulantes à base de extratos de algas em oliveiras da cv. Cobrançosa através dos frutos e azeites por meio da avaliação biométrica, atividade antioxidante, parâmetros de qualidade, estabilidade oxidativa e análise sensorial.

A análise dos resultados permitiu verificar que ao nível o fruto, o tratamento 3 (Algaman B) colaborou para um maior peso, tamanho e comprimento do fruto e respetivo endocarpo. Além disso, a aplicação dos bioestimulantes ocasionou uma redução na atividade antioxidante dos frutos, sendo essa redução visível nos ensaios de DPPH e poder redutor. Já nos azeites, os parâmetros de qualidade não foram afetados com a utilização dos bioestimulantes, podendo caracterizá-los como azeites virgens extra. Os bioestimulantes em especial Fitoalgas Green (tratamento 2) ocasionou a menor atividade antioxidante em todos os métodos avaliados nos azeites. Quanto ao perfil sensorial dos azeites, sendo este avaliado através da análise sensorial por meio das sensações olfativas e gustativas, verifica-se que os bioestimulantes colaboram para a formação de azeites mais amargos e picantes. Contudo levou a um decréscimo da intensidade das sensações sobretudo das sensações de frutos. Embora escassa as informações sobre a influência de bioestimulantes na cv. Cobrançosa, a realização deste trabalho gerou resultados importantes, sendo possível servir de base para o desenvolvimento de novos estudos acerca dos os efeitos de bioestimulantes à base de extrato de algas em oliveiras tanto a nível do fruto quanto no azeite para que assim, possam contribuir com a melhoria da performance desta cultura diante dos stresses abióticos ocasionados pelas mudanças climáticas.

6. Referências

- Almadi, L., Paoletti, A., Cinosi, N., Daher, E., Rosati, A., Di Vaio, C., & Famiani, F. (2020). A Biostimulant Based on Protein Hydrolysates Promotes the Growth of Young Olive Trees. *Agriculture*, *10*(12), 618.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10120618>
- Alvez, M. R., Cunha, S. C., Amaral, J. S., Pereira, J. A., & Oliveira, M. B. (2005). Classification of PDO olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, *549*(1-2), 166–178.
- Aparicio-Ruiz, R., & Gandul-Rojas, B. (2014). Decoloration kinetics of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by autoxidation. *Food research international*, *16*, 199–206.
- Arenas-Castro, S., Gonçalves, J. F., Moreno, M., & Villar, R. (2020). Projected climate changes are expected to decrease the suitability and production of olive varieties in southern Spain. *Science of The Total Environment*, *709*, 136161.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136161>
- Bajpai, S., Shukla, P. S., Asiedu, S., Pruski, K., & Prithiviraj, B. (2019). A Biostimulant Preparation of Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum* Suppresses Powdery Mildew of Strawberry. *The Plant Pathology Journal*, *35*(5), 406–416.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0066>
- Bantis, F., & Koukounaras, A. (2022). *Ascophyllum nodosum* and Silicon-Based Biostimulants Differentially Affect the Physiology and Growth of Watermelon Transplants under Abiotic Stress Factors: The Case of Drought. *Horticulturae*, *8*(12), 1177. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121177>
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, *72*(3), 1157–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. *AOCS press*, 41–72.

- Bouarroudj, K., Tamendjari, A., & Larbat, R. (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*, 83, 484–491.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.081>
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., & Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): Overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30(4), 449–462.
<https://doi.org/10.1007/s00299-010-0991-9>
- Brito, C., Dinis, L.-T., Silva, E., Gonçalves, A., Matos, C., Rodrigues, M. A., Moutinho-Pereira, J., Barros, A., & Correia, C. (2018). Kaolin and salicylic acid foliar application modulate yield, quality and phytochemical composition of olive pulp and oil from rainfed trees. *Scientia Horticulturae*, 237, 176–183.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.019>
- Brito, Dinis, Moutinho-Pereira, & Correia. (2019). Drought Stress Effects and Olive Tree Acclimation under a Changing Climate. *Plants*, 8(7), 232.
<https://doi.org/10.3390/plants8070232>
- Cardoso, L. G. V., Barcelos, M. de F. P., Oliveira, A. F. de, Pereira, J. de A. R., Abreu, W. C. de, Pimentel, F. de A., Cardoso, M. das G., & Pereira, M. C. de 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(1), 127–135.
- Carlos, S. D. M., Cunha, D. A. D., & Pires, M. V. (2019). Conhecimento sobre mudanças climáticas implica em adaptação? Análise de agricultores do Nordeste brasileiro. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 57(3), 455–471.
<https://doi.org/10.1590/1806-9479.2019.187600>
- Castelo-Branco, V. N., & Torres, A. G. (2011). Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: Determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*, 24(1), 173–187. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000100017>
- Castillo-Luna, A., Ledesma-Escobar, C. A., Gómez-Díaz, R., & Priego-Capote, F. (2022). The secoiridoid profile of virgin olive oil conditions phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 395, 133585.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133585>

- Chouliaras, V., Tasioula, M., Chatzissavvidis, C., Therios, I., & Tsabolatidou, E. (2009). The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki: Effect of seaweed extract on olive tree nutritional status and productivity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(6), 984–988. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3543>
- Cirillo, A., De Luca, L., Graziani, G., Cepparulo, M., El-Nakhel, C., Giordano, M., Roupheal, Y., Ritieni, A., Romano, R., & Di Vaio, C. (2022). Biostimulants Application on *Olea europaea* L. in Mediterranean Conditions Increase the Production and Bioactive Compounds of Drupes and Oil. *Agriculture*, 12(12), 2173. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122173>
- Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., & Piga, A. (2020). Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods*, 9(4), 514. <https://doi.org/10.3390/foods9040514>
- Corsi, S., Ruggeri, G., Zamboni, A., Bhakti, P., Espen, L., Ferrante, A., Nosedà, M., Varanini, Z., & Scarafoni, A. (2022). A Bibliometric Analysis of the Scientific Literature on Biostimulants. *Agronomy*, 12(6), 1257. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061257>
- Costa, S. M. L., Melloni, R., & Ferreira, G. M. D. R. (2019). Potencial biotecnológico de microrganismos do solo na olivicultura do Brasil: Uma revisão. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 12(2), 723. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2019v12n2p723-747>
- Coutinho, E. F. (Org.). (2015). *Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil*. EMBRAPA.
- Coutinho, E. F., Cappellaro, T. H., Ribeiro, F. C., & Haerter, J. A. (2009). Introdução e Importância Econômica. Em *Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)* (1º ed, p. 17–20). Embrapa Clima Temperado. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783494/1/sistema16.pdf>
- Coutinho, E. F., Wrege, M. S., Júnior, C. R., Almeida, I. R. de, & Steinmetz, S. (2009). Clima. Em *Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)* (1º ed, p. 21–28). Embrapa Clima Temperado. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783494/1/sistema16.pdf>
- Cunha, S. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. (2006). Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas

- chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1128(1-2), 220–227.
- Da Silva Bragueroli, H., Roberto Da Silva, T., Luis Reis Simas, D., & Jorge Ribeiro Da Silva, A. (2019). Analysis of Acylglycerols in Samples of Commercial Olive Oils by High Performance Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detector (Corona CAD) and Chemometric Methods. *Revista Virtual de Química*, 11(5), 1513–1520. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190105>
- Dias, M. C., Araújo, M., Silva, S., & Santos, C. (2022a). Sustainable Olive Culture under Climate Change: The Potential of Biostimulants. *Horticulturae*, 8(11), 1048. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111048>
- Dias, M. C., Araújo, M., Silva, S., & Santos, C. (2022b). Sustainable Olive Culture under Climate Change: The Potential of Biostimulants. *Horticulturae*, 8(11), 1048. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111048>
- Duarte, R. M., Contreras, R. L. G., Contreras, F. R., Sánchez, J. C. A., & Durón, S. A. G. (2015). Efecto del paclobutrazol sobre el desarrollo y producción del olivo (*Olea europaea* L.). *Biotecnia*, 17(1), 20–23.
- Ennajeh, M., Vadel, A. M., Cochard, H., & Khemira, H. (2010). Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(4), 289–294. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512670>
- Fernandes-Silva, A., Oliveira, M., Santos, F., Sousa, J., Bento, R., Almeida, A., Pavão, F., Alves, C., Alves, P., & Ribeiro, A. C. (2018). *Grupo Operacional Olivicultura e Azeite: SustentOlive - Melhoria das práticas de rega e fertilização do olival nas explorações olivícolas em Trás-os-Montes para a sustentabilidade do olival*. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/19095>
- Fernandes-Silva, A., Rodrigues, J. R., Carvalho, R. P., Brito, C., Rodrigues, M. A., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. M. (2018). Avaliação do efeito do coberto vegetal do solo nos compostos fenólicos e na capacidade antioxidante das azeitonas. *II Simpósio Internacional de Águas, Solos e Geotecnologias (SASGEO)*, 169–169.
- Ferreira, A. I. R. (2012). *Influência da luz nos Parâmetros químicos de qualidade em azeites monovarietais* [Mestrado em Olivicultura e Azeite]. Universidade de Évora.

- Filoda, P. F., Chaves, F. C., Hoffmann, J. F., & Rombaldi, C. V. (2021). Olive oil: A review on the identity and quality of olive oils produced in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 43(3), e-847. <https://doi.org/10.1590/0100-29452021847>
- Fraga, H., Pinto, J. G., & Santos, J. A. (2020). Olive tree irrigation as a climate change adaptation measure in Alentejo, Portugal. *Agricultural Water Management*, 237, 106193. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106193>
- Freitas, M. L. D. A., Borba, R. J. de V., Cardoso, T. B., & Azevedo, M. L. (2022). Compostos fenólicos totais e clorofilas totais de azeite de oliva produzido na região da Serra Do Sudeste do RS. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2(14). <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/113294>
- Galindo, F. S., Filho, M. C. M. T., Buzetti, S., Alves, C. J., Garcia, C. M. de P., & Nogueira, L. M. (2019). Extrato de algas como bioestimulante da produtividade do trigo irrigado na região do cerrado. *Colloquium Agrariae*, 15(1), 130–140.
- Galindo, F. S., Nogueira, L. M., Bellote, J. L. M., Gazola, R. de N., Alves, C. J., & Filho, M. C. M. T. (2015). Desempenho agrônômico de milho em função da aplicação de bioestimulantes à base de extrato de algas. *Tecnol. & Ciên. Agropec*, 9(1), 13–19.
- Ghanbari, R., Anwar, F., 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(3), 3291–3340. <https://doi.org/10.3390/ijms13033291>
- Gonçalves, M. A. (2014). Diversidade de artrópodes associados à oliveira (*Olea europaea* L.), no Algarve. *Ecologi@*, 70–76.
- Gonçalves, M. A. (2016). Diversidade de himenópteros associados à cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) no sul de Portugal. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 25, 138–142.
- Gonçalves, S., & Gaivão, I. (2021). Natural Ingredients Common in the Trás-os-Montes Region (Portugal) for Use in the Cosmetic Industry: A Review about Chemical Composition and Antigenotoxic Properties. *Molecules*, 26(17), 5255. <https://doi.org/10.3390/molecules26175255>
- Gouvinhas, I., Machado, N., Sobreira, C., Domínguez-Perles, R., Gomes, S., Rosa, E., & Barros, A. (2017). Critical Review on the Significance of Olive

- Phytochemicals in Plant Physiology and Human Health. *Molecules*, 22(11), 1986. <https://doi.org/10.3390/molecules22111986>
- Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., & Xiao, J. (2018). Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1091–1110. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9526-0>
- Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2015/541591>
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090–2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>
- Hernández-Hernandez, G., Salazar, D. M., Martínez-Tomé, J., & López-Cortés, I. (2019). The Use of Biostimulants in High-density Olive Growing: Quality and Production. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*, 1–14. <https://doi.org/10.9734/ajaar/2019/v10i430034>
- Hubel Verde. (2015). *Ficha Técnica de Produto: E-DALGIN*. https://hubel.pt/uploads/product_documents/e-dalgin_-_Ficha_Tecnica_iaBmAes.pdf
- Hubel Verde. (2017a). *Ficha Técnica de Produto: ALGAMAN B*. https://hubel.pt/uploads/product_documents/Algaman_B_Ficha_Tecnica-00204.pdf
- Hubel Verde. (2017b). *Ficha Técnica de Produto: DALGIN MG*. https://www.hubel.pt/uploads/product_documents/Dalgin_Mg_FT-P-051_OtrDnm5.pdf
- Instituto Nacional de Estatística. (2022a). *Superfície das principais culturas agrícolas (ha) por Localização geográfica (Região agrária) e Espécie; Anual*. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000019&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística. (2022b). *Estatísticas Agrícolas 2021* (p. 145) [Publicação periódica]. Instituto Nacional de Estatística, I. P.

- https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=31589846&PUBLICACOESmodo=2
- International Olive Council. Guide for the Determination of the Characteristics of Oil-Olives; COI/OH/Doc. No 1 November 2011; IOC: Madrid, Spain, 2011; 39p.
- Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food chemistry*, 100(1), 273–286.
- Lamas, S., Rodrigues, N., Fernandes, I. P., Barreiro, M. F., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2021). Fourier transform infrared spectroscopy-chemometric approach as a non-destructive olive cultivar tool for discriminating Portuguese monovarietal olive oils. *European Food Research and Technology*, 247(10), 2473–2484. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03809-8>
- Leogrande, R., El Chami, D., Fumarola, G., Di Carolo, M., Piegari, G., Elefante, M., Perrelli, D., & Dongiovanni, C. (2022). Biostimulants for Resilient Agriculture: A Preliminary Assessment in Italy. *Sustainability*, 14(11), 6816. <https://doi.org/10.3390/su14116816>
- Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-de La Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., Abia, R., & Muriana, F. J. G. (2014). Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), 1638–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: Effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.12.004>
- Machado, A. F. de F., Antoniassi, R., Guedes, A. M. M., & Wilhelm, A. E. (2018). *Método de Análise de Tocoferóis em Azeite de Oliva por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa*. Embrapa Agroindústria de Alimentos. <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1104313&bibliot>

eca=vazio&busca=1104313&qFacets=1104313&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1

- Mairech, H., López-Bernal, Á., Moriondo, M., Dibari, C., Regni, L., Proietti, P., Villalobos, F. J., & Testi, L. (2021). Sustainability of olive growing in the Mediterranean area under future climate scenarios: Exploring the effects of intensification and deficit irrigation. *European Journal of Agronomy*, *129*, 126319. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2021.126319>
- 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(1)*, 92–97.
- Mello, L. D., & Pinheiro, M. F. (2012). Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alim. Nutr*, *23(4)*, 537–548.
- Melo-Abreu, J. P. de, Maia, F. B., Vasconcelos, P., Ribeiro, A. C., Barba, N. G., Barros, F., Cordeiro, A. M., & Neves, A. (2012). Qualidade do azeite e sua relação com a cultivar e o clima em Portugal. *VI Simpósio Nacional de Olivicultura*. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/9412>
- Miho, H., Moral, J., Barranco, D., Ledesma-Escobar, C. A., Priego-Capote, F., & Díez, C. M. (2021). Influence of genetic and interannual factors on the phenolic profiles of virgin olive oils. *Food Chemistry*, *342*, 128357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128357>
- Montealegre, C., Marina, A. M., & García-Ruiz, C. (2010). Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58(1)*, 28–38.
- Nazir, A., Iqbal, H., Jilani, M., Altaf, A., Masood, N., AlMasoud, N., Alomar, T. S., & Iqbal, M. (2022). Physicochemical Traits, Variation in Oil Contents and Comparative Analysis of Selected Varieties of *Olea Europaea* Cultivated under Specific Agro-Ecological Conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, *31(5)*, 4223–4228. <https://doi.org/10.15244/pjoes/148063>
- Oliari, I. C. R., Hennerich, J. E., Sato, A. J., Faria, C. D. R., & Botelho, R. V. (2013). Extratos de Algas na produção e qualidade de ameixeiras cv. Pluma 7. *Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia - Porto Alegre/RS*, *8(2)*, 4.

- Oliveira, A. C. D., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689–702. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>
- Oliveira, A. F. D., Pasqual, M., Chalfun, N. N. J., Regina, M. D. A., & Del Rio Rincón, C. (2003). Influência do número de nós em estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) no enraizamento sob câmara de nebulização. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(2), 332–338. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000200012>
- Oliveira, F. de A. de, Medeiros, J. F. de, Cunha, R. C. da, Souza, M. W. de L., & Lima, L. A. (2016). Use of biostimulants in relieving salt stress in popcorn. *REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA*, 47(2). <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160036>
- Oliveira, N. P., Ribeiro, S. A. F., & Souza, M. M. de. (2021). Controle de contaminação e oxidação no cultivo in vitro de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. “Koroneiki”. *Research, Society and Development*, 10(5), e30710514929. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14929>
- Özdemir, İ. S., Dağ, Ç., Özinanç, G., Suçsoran, Ö., Ertaş, E., & Bekiroğlu, S. (2018). Quantification of sterols and fatty acids of extra virgin olive oils by FT-NIR spectroscopy and multivariate statistical analyses. *LWT*, 91, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.045>
- Ozturk, M., Altay, V., Gönenc, T. M., Unal, B. T., Efe, R., Akçiçek, E., & Bukhari, A. (2021). An Overview of Olive Cultivation in Turkey: Botanical Features, Eco-Physiology and Phytochemical Aspects. *Agronomy*, 11(2), 295. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020295>
- Pacetta, Cosmo Fernando. (2013). *Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas oliveiras (Olea europaea) contendo oleuropeína* [Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo]. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-05052014-135759/publico/ME7247294COR.pdf>
- Pereira, L., Morrison, L., Shukla, P. S., & Critchley, A. T. (2020). A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 3561–3584. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02246-6>
- Peres, A. M., Baptista, P., Malheiro, R., Dias, L. G., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes

- region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 105(1), 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.11.001>
- Peres, F., Martins, L. L., & Ferreira-Dias, S. (2017). Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3104–3126.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1092107>
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., & Giannakoula, A. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.014>
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. (2013). Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Analytical Methods*, 6(1), 123–132.
<https://doi.org/10.1007/s12161-012-9420-8>
- Portarena, S., Leonardi, L., Scartazza, A., Lauteri, M., Baldacchini, C., Farinelli, D., & Brugnoli. (2019). Combining analysis of fatty acid composition and $\delta^{13}\text{C}$ in extra-virgin olive oils as affected by harvest period and cultivar: Possible use in traceability studies. *Food Control*, 105, 151–158.
- Proietti, P., Nasini, L., Del Buono, D., D'Amato, R., Tedeschini, E., & Businelli, D. (2013). Selenium protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. *Scientia Horticulturae*, 164, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.034>
- 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 Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Regulamento (UE) N°2022/2105 da Comissão de 29 de julho de 2022. *Jornal Oficial da União Europeia* (L 284/23, p. 1-26)
- Regulamento (UE) N°2019/1009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de junho de 2019. *Jornal Oficial da União Europeia* (L 170/1, p.1-114)
- Rodrigues, N., Casal, S., Peres, A. M., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2020). Seeking for sensory differentiated olive oils? The urge to preserve old autochthonous olive

- cultivars. *Food Research International*, 128, 108759.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108759>
- Rodrigues, N., Peres, F., Casal, S., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Peres, A. M., & Alberto Pereira, J. (2023). Geographical discrimination of olive oils from Cv. ‘Galega Vulgar’. *Food Chemistry*, 398, 133945.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133945>
- Rodríguez-Méndez, M. L., Apetrei, C., & De Saja, J. A. (2008). Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. *Electrochimica Acta*, 53(20), 5867–5872.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.04.006>
- Romero, H., Pott, D. M., Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2021). Metabolomics-Based Evaluation of Crop Quality Changes as a Consequence of Climate Change. *Metabolites*, 11(7), 461. <https://doi.org/10.3390/metabo11070461>
- Sales, H., Nunes, J., & Vaz Patto, M. C. (2020). Achievements and Challenges towards a Sustainable Conservation and Use of ‘Galega vulgar’ *Olea europaea* Variety. *Agronomy*, 10(10), 1467. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101467>
- Salomão, F. R. (2019). *Potencial micotrófico de variedades de oliveira (Olea europaea L.) no Brasil* [Programa de Pós Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos]. Universidade Federal De Itajubá.
- Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García De La Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593(1), 103–107.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>
- Santini, J. M. K., Perin, A., Santos, C. G. dos, Ferreira, A. C., & Salib, G. C. (2015). Viabilidade técnico-econômica do uso de bioestimulantes em semente de soja. *Tecnol. & Ciên. Agropec*, 9(1), 57–62.
- Scherer, R., & Böckel, W. J. (2018). Avaliação dos teores de ácidos graxos presentes em azeites de oliva extra virgem comercializados no vale do taquari. *Revista Destaques Acadêmicos*, 10(4). <https://doi.org/10.22410/issn.2176-3070.v10i4a2018.2041>
- Serrano, L., Cruz, A., Sousa, S., & Morais, Z. (2016). Alterations in monovarietal, blended and aromatized Portuguese virgin olive oils under four storage

- conditions for 12 months. *European Food Research and Technology*, 242(7), 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2609-5>
- Shahrajabian, M. H., Chaski, C., Polyzos, N., & Petropoulos, S. A. (2021). Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules*, 11(5), 698. <https://doi.org/10.3390/biom11050698>
- Silva, A. A. F. (2008). *Necessidades Hídricas e Resposta da Oliveira (olea europaea l.) Ao Deficit Hídrico na Região da Terra Quente* [Doutorado em Engenharia Agrícola]. Universidade De Trás-Os-Montes E Alto Douro.
- Silva, B. S., & Schmiele, M. (2021). From olive to olive oil: A general approach. *Research, Society and Development*, 10(3), e32210313408. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13408>
- Silva, L. F. D. O. D., Oliveira, A. F. D., Pio, R., Alves, T. C., & Zambon, C. R. (2012). Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. *Bragantia*, 71(2), 202–209. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000200008>
- Silva, S. D. S., Assis, R. Q., Rios, A. O., & Ogeda, C. H. (2019). Avaliação comparativa dos parâmetros físico-químicos de azeites de oliva produzidos no estado do Rio Grande do Sul com azeites de oliva importados. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 13(1). <https://doi.org/10.3895/rbta.v13n1.5972>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.*, 144–158.
- Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2014). Antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrançosa olives affected through the maturation process. *Journal of Functional Foods*, 11, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.024>
- Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2015). Optimal harvesting period for cvs. Madural and Verdeal Transmontana, based on antioxidant potential and phenolic composition of olives. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.046>
- Sousa, C. T., Cardozo, M. M. C., Bruscatto, M. H., Dutra, F. L. G., & Zambiazzi, R. C. (2013). Teor de tocoferóis em azeites de oliva extraídos em diferentes índices de maturação. *XXII Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas*, 1–4.

- Souza, E. C. D., Cordeiro, D. A., Silva, B. S., Neves, N. D. A., & Schmiele, M. (2022). Development of muffin with the incorporation of olive pomace flour, extra virgin olive oil and hydrolyzed soy protein. *Research, Society and Development*, *11*(2), e58511226012. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.26012>
- Tasioula-Margari, M., Stamatakos, G., Chatzissavvidis, C., Mantzoutsos, I., Chytiri, A., & Chouliaras, V. (2011). The effect of commercial seaweed extracts and commercial liquid organic nitrogen foliar sprays on productivity, oil quality and nutritional status of the olive cultivar ‘Mastoidis’. *Conference: Olivebioteq 2011, 4th International conference on ‘Olive Culture and Biotechnology of Olive Tree Products*, *2*, 475–479.
- Tekaya, M., Dabbaghi, O., Guesmi, A., Attia, F., Chehab, H., Khezami, L., Algathami, F. K., Ben Hamadi, N., Hammami, M., Prinsen, E., & Mechri, B. (2022). Arbuscular mycorrhizas modulate carbohydrate, phenolic compounds and hormonal metabolism to enhance water deficit tolerance of olive trees (*Olea europaea*). *Agricultural Water Management*, *274*, 107947. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107947>
- Therios, I.N. *Olives*; CABI: Oxfordshire, UK, 2009
- Torres, M., Pierantozzi, P., Searles, P., Rousseaux, M. C., García-Inza, G., Miserere, A., Bodoira, R., Contreras, C., & Maestri, D. (2017). Olive Cultivation in the Southern Hemisphere: Flowering, Water Requirements and Oil Quality Responses to New Crop Environments. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1830. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01830>
- Tradecorp. (2020). *Fitoalgas Green*. <https://tradecorp.pt/wp-content/uploads/2022/03/Ficha-T%C3%A9cnica-FITOALGAS-GREEN-Tradecorp-Portugal.pdf>
- UPOV-International Union for the Protection of New Varieties of Plants. (2011). *Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability*. https://www.upov.int/upov_collection/en/
- Veloso, A. C. A., Rodrigues, N., Ouarouer, Y., Zaghdoudi, K., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2020). A Kinetic- Thermodynamic Study of the Effect of the Cultivar/Total Phenols on the Oxidative Stability of Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, *97*(6), 625–636. <https://doi.org/10.1002/aocs.12351>

- Vicentino, A. R. R., & Menezes, F. D. S. (2007). Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(3), 384–387. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300014>
- Vieira, L. M., Castro, C. F. S., Dias, A. L. B., & Silva, A. R. (2015). Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 521–527. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_033
- Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. A., & Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.001>
- Wrege, M. S., Coutinho, E. F., Pantano, A. P., & Jorge, R. O. (2015a). Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(3), 656–666. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-174/14>
- Wrege, M. S., Coutinho, E. F., Pantano, A. P., & Jorge, R. O. (2015b). Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(3), 656–666. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-174/14>
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Zhang, Y., Zhang, C., Xu, C., Deng, Y., Wen, B., Xie, P., & Huang, L. (2022). Effect of geographical location and soil fertility on main phenolic compounds and fatty acids compositions of virgin olive oil from Leccino cultivar in China. *Food Research International*, 157, 111207. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111207>
- Zielewicz, W., Swędrzyński, A., Dobrzyński, J., Swędrzyńska, D., Kulkova, I., Wierzchowski, P. S., & Wróbel, B. (2021). Effect of Forage Plant Mixture and Biostimulants Application on the Yield, Changes of Botanical Composition, and Microbiological Soil Activity. *Agronomy*, 11(9), 1786. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091786>