

AZEITES AROMATIZADOS: Estudo da Influência do Agente Aromatizante na Composição Química e Resistência à Oxidação

Hugo Manuel Lamas Gomes da Costa

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

Orientado por

Professor Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Bragança

2012

O trabalho que se apresenta teve o apoio financeiro de:

Projeto “*OlivaTMAD – Rede Temática de Informação e Divulgação da Fileira Olivícola em Trás-os-Montes e Alto Douro*”. PRODER, Medida 4.2.2.2.



Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira, pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela ajuda na definição do objeto de estudo, pela exigência e rigor, pela orientação científica, pelos proveitosos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pelos oportunos conselhos, pela acessibilidade, cordialidade, simpatia e humor sempre presentes, pela confiança que sempre me concedeu e pelos permanentes estímulos que, por vezes, se tornaram decisivos em inúmeros momentos.

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

Aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigado pelos saberes que me foram transmitidos.

À Professora Doutora Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por todo o auxílio prestado na determinação da composição em ácidos gordos e tocoferóis.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Anabela Sousa, Ivo Oliveira, Nuno Rodrigues e Ricardo Malheiro, pela perseverança, pelo apoio, incentivo, auxílio e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho.

À Cooperativa de Olivicultores de Vila Flor e Ansiães, na pessoa do Eng. Hélder Teixeira, as facilidades na obtenção das amostras.

Aos meus colegas e amigos de curso, Carla Nogueira, Joana Correia, João Silva e Susete Coelho, pelo convívio e amizade, compreensão e estudos.

Aos meus irmãos que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos.

Aos meus pais Margarida e José Luís, é com grande alegria e gratidão que lhes dedico esta minha vitória, uma vez que me possibilitaram todo o suporte seja ele emocional ou financeiro, no decorrer da minha vida. A conquista é nossa.”Veni, vidi, vici” (Júlio César).

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	VII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE QUADROS.....	XIX
CAPÍTULO I – Introdução.....	1
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE.....	7
2.1.1. <i>Fração Maioritária</i>	7
2.1.1.1. Triglicéridos.....	7
2.1.1.2. Ácidos Gordos.....	8
2.1.1.3. Mono e Diglicéridos.....	10
2.1.2. <i>Fração Minoritária</i>	10
2.1.2.1. Hidrocarbonetos.....	10
2.1.2.2. Tocoferóis e Tocotrienóis.....	10
2.1.2.3. Compostos Fenólicos.....	11
2.1.2.4. Fosfolípidos.....	12
2.1.2.5. Ceras.....	13
2.1.2.6. Clorofilas e Carotenóides.....	13
2.1.2.7. Álcoois Alifáticos e Triterpénicos.....	14
2.1.2.9. Esteróis.....	15
2.1.2.10. Compostos Voláteis e Aromáticos.....	16
2.2. AZEITES AROMATIZADOS.....	17
2.2.1. <i>Definição de Azeites Aromatizados</i>	18
2.2.2. <i>Ervas e Especiarias Utilizadas em Azeites Aromatizados</i>	18
2.2.2.1. Alho.....	19

2.2.2.2. Louro.....	19
2.2.2.3. Malagueta	20
2.2.2.4. Orégãos	20
2.2.2.5. Pimenta Preta	20
2.2.3. <i>Propriedades dos Aromatizantes</i>	21
CAPÍTULO III – Material e Métodos	25
3.1. AMOSTRAGEM.....	27
3.2. PARÂMETROS DE QUALIDADE	27
3.2.1. <i>Acidez</i>	27
3.2.2. <i>Índice de Peróxido</i>	28
3.2.3. <i>Espectrofotometria no Ultravioleta</i>	28
3.3. ÁCIDOS GORDOS	29
3.4. TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS	30
3.5. TEOR EM FENÓIS TOTAIS.....	31
3.6. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES.....	31
3.6.1. <i>Atividade Sequestradora do Radical DPPH (DPPH[•])</i>	31
3.6.2. <i>Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS^{•+})</i>	32
3.7. ESTABILIDADE OXIDATIVA	32
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.8.1. <i>Análise de Variância</i>	33
3.8.2. <i>Análise de regressão</i>	34
3.8.3. <i>Análise de componentes principais</i>	34
CAPÍTULO IV – Resultados e Discussão.....	35
4.1. PARÂMETROS DE QUALIDADE	37
4.1.1. <i>Acidez</i>	38
4.1.2. <i>Índice de Peróxido</i>	38

4.1.3. Espectroscopia no Ultravioleta.....	39
4.2. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS	40
4.3. COMPOSIÇÃO EM TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS	42
4.4. TEOR EM FENÓIS TOTAIS.....	43
4.5. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES.....	44
4.5.1. Atividade Sequestradora do radical DPPH (DPPH [•]).....	44
4.5.2. Atividade Sequestradora do radical ABTS (ABTS ^{•+}).....	45
4.6. ESTABILIDADE OXIDATIVA	46
4.7. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	47
CAPÍTULO V – Conclusão.....	49
CAPÍTULO VI - Bibliografia	53

RESUMO

Nas últimas décadas, o azeite tem vindo a tomar um lugar de destaque na dieta humana devido aos benefícios para a saúde, que advêm da sua composição química, e às características organolépticas que lhe conferem propriedades únicas. O azeite devido à sua composição, é muito suscetível de sofrer oxidação lipídica, causando perdas ao nível das suas qualidades nutricionais e organolépticas. Neste sentido, com o trabalho apresentado, pretende-se estudar se o agente aromatizante (alho, louro, malagueta, orégãos e pimenta preta) afeta a composição química e resistência à oxidação do azeite. Esta avaliação foi realizada ao nível dos parâmetros de qualidade, composição físico-química, resistência à oxidação e atividade antioxidante.

Os resultados dos parâmetros de qualidade mostrou que a adição de alho para a acidez, alho e orégãos, no valor de peróxido, causam alterações destes valores. O azeite aromatizado com alho mostrou um aumento da acidez, e, no caso do valor de peróxido, a adição de especiarias (alho e orégãos) diminuiu os valores das referidas amostras. Em relação aos coeficientes de extinção específicos, verificou-se que tanto o alho como orégãos diminuiu os valores de K_{232} , enquanto que K_{270} , as amostras aromatizadas com malagueta e pimenta mostrou um ligeiro aumento dos referidos valores. A análise físico-química mostrou que em todas as amostras, os ácidos gordos mais abundantes são o ácido oleico (aprox. 75%), seguido do ácido palmítico e linoleico. A adição de especiarias ao azeite fez aumentar a relação (MUFA + PUFA)/SFA em comparação com o azeite não aromatizado. A vitamina E não sofreu perdas significativas com a adição de especiarias, e o vitâmero mais abundante é o α -tocoferol. No que respeita aos fenóis totais, a adição de especiarias induziu perdas significativas nestes valores ($P < 0,001$). Nos ensaios de antioxidantes (DPPH[•] e ABTS^{*+}), apenas do azeite aromatizado com um alho reduziu a atividade sequestradora de DPPH[•] e o azeite com aroma a malagueta baixou a atividade sequestradora de ABTS^{*+}, significativamente. A adição de especiarias melhorou a estabilidade oxidativa, exceto para o azeite aromatizado com folhas de louro. Os resultados obtidos permitem afirmar que a adição dos agentes aromatizantes não alterou significativamente os parâmetros de qualidade dos azeites, podendo favorecer um aumento da sua resistência e conseqüentemente um aumento do tempo de prateleira do produto.

Palavras-chave: Azeite, especiarias, atividade antioxidante, estabilidade oxidativa

ABSTRACT

In recent decades, olive oil has taken a prominent place in human diet, due to the health benefits that come from their chemical composition, as well as for its organoleptic characteristics, that give it unique properties. Olive oil, due to its composition, is very likely to suffer lipid oxidation, which cause a decrease on both nutritional and organoleptic qualities. In this sense, the present work intends to study whether the flavouring agent (garlic, bay leaves, chilli pepper, oregano and black pepper) affects the chemical composition and oxidation resistance of the olive oil. This evaluation took place at the level of quality parameters, physicochemical composition, resistance to oxidation and antioxidant activity.

Results from the quality parameters showed that, the addition of garlic, for acidity, and garlic or oregano, in the peroxide value, caused variations in those values. The olive oil flavoured with garlic showed an increase on the free acidity, and, in the case of the peroxide value, the addition of spices (garlic or oregano), decreased the values of those samples. Regarding the specific extinction coefficients, it was found that both garlic and oregano lowered the values of K_{232} , while for K_{270} , the samples flavoured with chilli-pepper and black-pepper showed a slight increase of those values.

Physicochemical analysis showed that in all samples, the most abundant fatty acids are oleic acid (approx. 75%), followed by palmitic and linoleic acid. The addition of spices to olive oil increase the ratio (MUFA + PUFA) / SFA compared with the olive oil non-flavoured. Vitamin E did not suffer significant losses with the addition of spices, and the α -tocopherol vitamer is the most abundant. With regard to the total phenol content, the addition of flavouring spices induced significant losses in these values ($P < 0.001$). In the antioxidant assays (DPPH \cdot and ABTS \cdot^+), only the flavouring of olive oil with either garlic or chilli-pepper caused variations on the results. The addition of garlic cause a reduction on the scavenging activity of DPPH radicals, while the samples flavoured with chilli-pepper presented lower values for the scavenging activity of ABTS radicals values significantly. The addition of spices improved the oxidative stability, except for olive oil flavoured with bay leaves. The results obtained allow to affirm that the addition of flavouring agents do not significantly alter the parameters of quality of olive oils and may promote an increase in resistance, hence a longer shelf life product.

Keywords: Olive oil, spices, antioxidant activity, oxidative stability

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do glicerol e ácido gordo, e a formação do triglicérido.....	7
Figura 2 - Principais ácidos gordos presente no azeite.....	9
Figura 3 - Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.	11
Figura 4 – Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.	14
Figura 5 – Estrutura química da clorofila (a e b).....	14
Figura 6 – Estrutura química do β -sitosterol.	15
Figura 7 – Valores médios de fenóis totais do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-c} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).	43
Figura 8 – Valores médios da atividade sequestradora do radical DPPH do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-d} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).	44
Figura 9 – Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-b} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).	45
Figura 10 – Valores médios de estabilidade oxidativa (horas) do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-c} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$)...	46
Figura 11 – Gráfico das componentes principais Dimensão 1, Dimensão 2 e Dimensão 3 com representação dos seis azeites estudados.....	48

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Limites na composição ¹ em ácidos gordos determinados por GC.	9
Quadro 2 – Limites à composição esterólica em azeites.	16
Quadro 3 – Alguns compostos aromáticos encontrados em azeite.	17
Quadro 4 – Lista de compostos antioxidantes e voláteis aromáticos isolados em amostras de ervas e especiarias.	22
Quadro 5 – Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O ₂ /Kg); K ₂₃₂ ; K ₂₇₀ e ΔK] do azeite com e sem adição de aromatizantes (média ± desvio padrão).	37
Quadro 6 – Valores médios do perfil em ácidos gordos do azeite com e sem adição de aromatizantes (média ± desvio padrão).	41
Quadro 7 – Valores médios de tocoferóis, tocotrienóis e vitamina E total (mg/Kg) do azeite com e sem adição de aromatizantes (média ± desvio padrão).	42
Quadro 8 – Coeficientes das componentes principais	47

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

No reino vegetal vários são os frutos e/ou sementes que fornecem óleos comestíveis. Estes óleos são semelhantes em muitos aspetos, mas existem pequenas diferenças que têm um efeito significativo sobre as suas características físico-químicas.

De entre todos os óleos comestíveis, o azeite tem vindo, nas últimas décadas, a tomar um lugar de destaque, devido aos benefícios para a saúde e às características organolépticas que advêm da sua composição. Esta é influenciada por vários aspetos como sejam as boas práticas de manipulação, colheita, armazenamento e processamento.

O azeite tem sido, ao longo dos séculos, amplamente utilizado na cozinha mediterrânica. Das diversas categorias comerciais de azeite, o virgem extra é aquele com melhor aceitabilidade por parte dos consumidores. As características químicas e organolépticas do azeite têm sido reconhecidamente comprovadas. A composição em ácidos gordos, com elevados teores de ácido oleico e o equilíbrio entre os ácidos gordos saturados e polinsaturados, está intimamente relacionada com os benefícios nutricionais atribuídos a esta gordura. Por outro lado, uma vez que é geralmente consumido cru, o azeite apresenta quantidades consideráveis de antioxidantes naturais (Moldão-Martins et al., 2004). Apesar da sua riqueza em compostos antioxidantes, o azeite é suscetível de sofrer oxidação lipídica, perdendo desta forma qualidades nutricionais e organolépticas (Issaoui et al., 2011).

No caso do azeite são exequíveis diversas vias para proceder à sua aromatização. Por um lado, parte dos aromatizantes, por exemplo: laranja, limão, alho, entre outros, podem ser adicionados durante o processo de extração do azeite, fazendo com que no processo de moenda e termobatedura ocorra a passagem do agente aromatizante para o azeite (Baiano et al., 2010). Contudo, o processo mais usual é após extração do azeite a adição direta do agente aromatizante ao mesmo. Neste processo é inserido o agente aromatizante, por exemplo: louro, alho, malagueta, algas, cogumelos, entre outros, no interior da embalagem, e esta é preenchida com azeite. Por difusão há passagem dos aromas do agente para o azeite. A aromatização com plantas, especiarias ou ervas aromáticas pretende melhorar o valor nutricional, modificar as características sensoriais e, por vezes, aumentar o tempo de prateleira (Antoun & Tsimidou, 1997).

A origem dos azeites aromatizados parece derivar de práticas de processamento e conservação antigas, onde os azeites adquiriam desta forma o sabor correspondente do aromatizante, e eram posteriormente usados na confeção de pratos de culinária e saladas (Gambacorta et al., 2007).

Hoje em dia, o sector olivícola português tem necessidade de se afirmar no mercado nacional e internacional, uma vez que a concorrência externa é forte e especializada. Para isso tem recorrido à inovação deste produto, tornando-o mais atrativo, e contribuindo para a inovação do sector. No mercado português e internacional, já existem alguns azeites aromatizado com diversas especiarias, nomeadamente, alho, orégãos, citrinos, ou mesmo partículas de ouro.

Neste sentido, com o trabalho apresentado, pretende-se estudar se o agente aromatizante (alho, louro, malagueta, orégãos e pimenta preta) exerce atividade ao nível da composição química e resistência à oxidação do azeite. A avaliação ocorreu ao nível da composição físico-química, resistência à oxidação e atividade antioxidante.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

A composição química do azeite varia de acordo com diferentes fatores, como a cultivar, o estado de maturação dos frutos, as condições agronômicas e características tecnológicas de produção.

Do ponto de vista da sua composição, o azeite pode dividir-se em duas frações, a maioritária e a minoritária (Firestone, 2005). A fração maioritária, variável entre 98,5% e 99,5%, é formada essencialmente por triglicéridos e, em menor amplitude, por ácidos gordos livres e outros glicéridos parciais (Boskou et al., 2006). A fração minoritária é formada, em grande parte, pelos compostos que podem ser obtidos após saponificação do azeite. Esta fração contém uma grande variedade de compostos que satisfazem uma vasta gama de funções, sendo os principais responsáveis pela estabilidade do azeite e as suas características organolépticas. Estes componentes minoritários, na sua grande maioria perdem-se, durante os processos de refinação, não estando presentes nos azeites refinados (Sánchez et al., 2001).

2.1.1. Fração Maioritária

2.1.1.1. Triglicéridos

São os principais componentes da fração saponificável. Como mostra a figura 1, os triglicéridos são tri-ésteres derivados da união do glicerol (um tri-álcool) com ácidos gordos, no qual os grupos funcionais do glicerol (grupos hidroxilo) reagem com o ácido carboxílico dos ácidos gordos. Assim, um triglicérido é formado por um conjunto de três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (Sánchez et al., 2001).

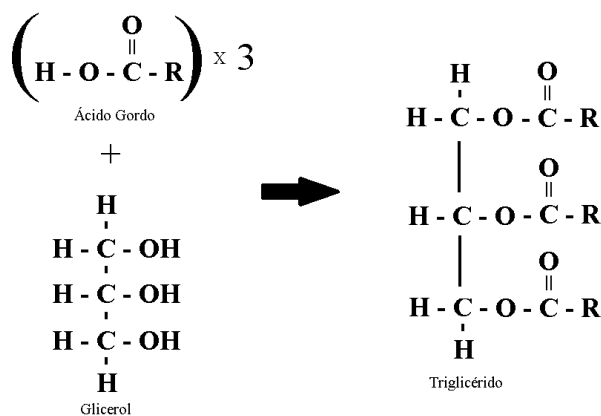


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do glicerol e ácido gordo, e a formação do triglicérido.

No azeite, a distribuição dos ácidos gordos nas moléculas de triglicéridos é assimétrica entre as posições do glicerol. Segundo Santinelli et al. (1992), a distribuição dos ácidos gordos não é aleatória, mas segue um padrão na qual os ácidos gordos da posição dois, da molécula do glicerol, são insaturados, ou seja, o ácido linolénico, por exemplo, é mais favorecido frente a ácidos gordos como o oleico e linoleico, para ocupar esta posição do tri-álcool. A posição dois do glicerol é ocupada por ácidos gordos saturados quando a sua concentração total é muito elevada, o que não acontece no caso do azeite.

Segundo Boskou (1996), os triglicéridos mais abundantes são:

OOO	Trioleína	40 – 59%
POO	Palmitodioleína	12 – 20%
OOL	Linoleodioleína	12.5 – 20%
POL	Palmitooleolinoleína	5.5 – 7%
SOO	Estearodioleína	3 – 7%

Segundo Tiscornia et al. (1982), os triglicéridos trisaturados (PPP, EEE, PEP, EPE, etc.) e os triinsaturados contendo ácido linolénico (PoPoLn), não ocorrem no azeite. Observando-se que a única molécula simétrica é a trioleína (OOO).

2.1.1.2. Ácidos Gordos

Como referido anteriormente, os óleos são semelhantes em inúmeros aspetos, mas existem pequenas diferenças que têm um efeito significativo sobre as suas características. Assim sendo, o azeite é um óleo vegetal que se diferencia de todos os outros devido ao seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados. O conteúdo em ácidos gordos livres é reduzido e variável, dependendo sobretudo da qualidade da matéria-prima. Os ácidos gordos livres na presença de glicerol, álcoois e terpenos, formam respetivamente triglicéridos, ceras e ésteres de terpenos ou ésteres de esteróis. Os azeites não contêm, ou contêm em pequenas quantidades, ácidos gordos ramificados, com número ímpar de carbonos ou mesmo ácidos gordos com menos de 16 e mais de 20 átomos carbonos (Harwood & Aparício, 1999). Os ácidos gordos maioritários presentes no azeite encontram-se esquematizados na figura 2.

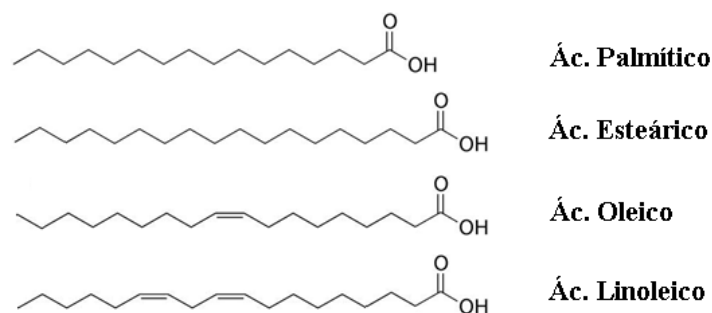


Figura 2 - Principais ácidos gordos presente no azeite.

Assim, os ácidos gordos maioritários são o oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0) e palmitoleico (C16:1). Os ácidos gordos linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenóico (C20:1), margárico (C17:0), beénico (C22:0), lignocérico (C24:0), e mirístico (C14:0) existem em menor quantidade (Sánchez et al., 2001). A composição em ácidos gordos é um parâmetro importante em termos de qualidade. Assim o Concelho Oleícola Internacional (COI) e a União Europeia, produziram documentos legais que impõem limites (quadro 1), nomeadamente para os ácidos gordos na posição *trans* para cada categoria de azeite. Os azeites virgem extra, não podem exceder para o caso do C18:1*t* e para a soma dos isómeros C18:2*t* e C18:3*t* o valor de 0,05% (Reg. (UE) n.º 61/2011; COI, 2006).

Quadro 1 – Limites na composição¹ em ácidos gordos determinados por GC.

Mirístico	C14:0	≤ 0,05
Palmítico	C16:0	7,5-20,0
Palmitoleico	C16:1	0,3-3,5
Margárico	C17:0	≤ 0,3
Esteárico	C18:0	0,5-5,0
Oleico	C18:1	55,0-83,0
Linoleico	C18:2	3,5-21,0
Linolénico	C18:3	≤ 1,0
Araquídico	C20:0	≤ 0,6
Eicosenóico	C20:1	≤ 0,4
Beénico	C22:0	≤ 0,2
Lignocérico	C24:0	≤ 0,2

¹ (% m/m ésteres de metilo); Fonte: COI, 2006

A composição em ácidos gordos difere de amostra para amostra, dependendo da zona de produção, da altitude, do clima, da variedade, e do estado da maturação dos frutos. (Boskou et al., 2006).

2.1.1.3. Mono e Diglicéridos

O azeite para além da maioria dos triglicéridos contém também glicéridos parciais. A presença de monoglicéridos e diglicéridos devem-se a hidrólises enzimáticas dos triglicéridos e a biossínteses incompletas dos mesmos (Firestone, 2005). De uma forma geral, os diglicéridos são mais abundantes que os monoglicéridos. Num azeite virgem extra, as concentrações de diglicéridos variam entre 1,0 e 2,8%, enquanto os monoglicéridos estão presentes em menos de 0,25% (Boskou et al., 2006).

2.1.2. Fração Minoritária

2.1.2.1. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos do azeite podem ser de natureza terpénica, esterólica ou policíclica aromática (Sánchez et al., 2001).

O esqualeno e o β -caroteno são os hidrocarbonetos terpénicos mais abundantes no azeite. A presença de esqualeno no azeite é considerada como parcialmente responsável pelos efeitos benéficos para a saúde e a sua ação quimiopreventiva contra certos tipos de cancro (Boskou et al., 2006). Representa 40% do peso total da fração insaponificável (Sánchez et al., 2001) e 90% dos hidrocarbonetos (Boskou et al., 2006). O β -caroteno, um dos responsáveis pela cor do azeite, é um terpeno de 40 átomos de carbono com concentrações de 0,5 a 4 mg/kg de azeite (Sánchez et al., 2001).

Os hidrocarbonetos de natureza esterólica existem em pequenas quantidades no azeite (< 0,5 mg/kg), sendo que a sua presença é associada a processos de refinação. O composto mais significativo é o estigmastadieno formado pelos processos de refinação a partir do β -sitosterol (Sánchez et al., 2001).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são muito residuais (1 a 700 μ g/kg) (Tiscornia et al., 1982).

2.1.2.2. Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis, os mais importantes fenóis lipofílicos, são compostos por um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral isoprenóide na posição 2 (figura 3). Podem contribuir para a estabilidade oxidativa dos azeites, pois têm um papel biológico importante como antioxidante, no entanto a sua ação na resistência à oxidação não é evidente. Como mostra a figura 3 os tocotrienóis apresentam três insaturações na cadeia lateral, nas posições 3, 7, e 11, distinguindo-se assim dos tocoferóis. Assim, existem 8 compostos,

designados por α -, β -, γ - e δ -, sendo que o α -tocoferol representa 90 a 95% do total de vitamina E (Sánchez et al., 2001). Este valor está dependente da cultivar, de fatores agronômicos e também de fatores tecnológicos. Belitz et al. (2009) consideram que devido à melhoria das condições de extração do azeite e a implementação de programas de Boas Práticas de Fabrico tiveram um impacto positivo importante no teor de tocoferóis dos azeites, sendo que atualmente os teores observados nos azeites são superiores aos verificados no passado. Referem que os valores médios de tocoferóis e tocotrienóis rondam os 100 mg/kg de azeite.

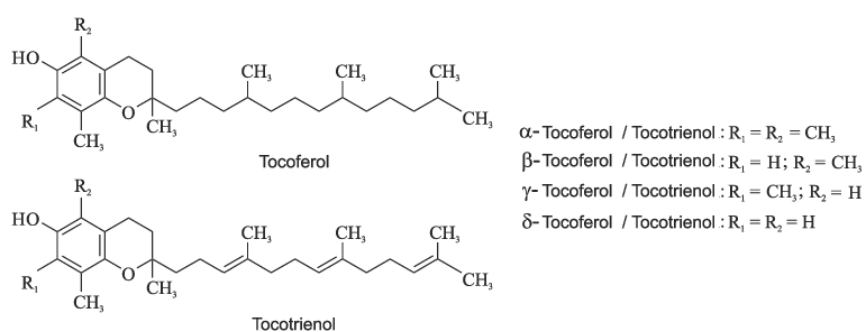


Figura 3 - Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.

2.1.2.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, nomeadamente os hidrofílicos, estão identificados como sendo responsáveis pela maior parte das propriedades antioxidantes dos azeites virgens. Estes compostos proporcionam ao azeite características únicas, uma vez que não se encontram em qualquer outro óleo vegetal (Boskou, 1996).

Os fenóis detetados no azeite ascendem a pelo menos 30 compostos (Tuck & Hayball, 2002). A composição fenólica dos azeites é bastante complexa e a sua concentração média depende de vários fatores, como por exemplo estado de maturação, a cultivar, as condições de armazenamento, condições climáticas e do tipo de tecnologia utilizada na sua produção (Boskou, 2008).

Estes compostos encontram-se divididos em diferentes categorias, tais como os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas (Servili et al., 2004). O grupo dos ácidos fenólicos, presente em pequenas quantidades, foi o primeiro a ser descrito no azeite, e divide-se em dois tipos – benzóico (ácido benzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico) e

cinâmico (ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico). O grupo dos álcoois fenólicos é composto maioritariamente pelo hidroxitirosol e tirosol (Bianco et al., 1998).

Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra, e apresentam-se na forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenóico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isómeros das agliconas da oleuropeína (princípio amargo da azeitona encontrado no azeite) e ligstrosídeo (Servili et al., 2004).

A oleuropeína, altamente concentrada na azeitona verde, é hidrolisada durante a maturação e durante o armazenamento após a colheita, produzindo várias moléculas mais simples, que caracterizam o sabor rico e complexo do azeite. Azeites ricos em compostos fenólicos são de uma maneira geral amargos e picantes. Na verdade, interações complexas entre os constituintes da fração minoritária resultam em azeites com adstringência e amargura, por vezes excessivas e desagradáveis como no caso dos azeites resultantes de azeitonas demasiado verdes. Geralmente os azeites produzidos a partir de azeitonas em estados de maturação menos avançados obtêm melhores classificações devido ao seu aroma “frutado”, “floral” e complexo, oriundo do seu alto teor de fenóis. Em síntese, os elevados níveis de fenóis conferem aos azeites uma elevada estabilidade e um sabor frutado forte (Visioli et al., 2006).

Relativamente às lignanas, foram identificadas especificamente dois compostos, nomeadamente pinosresinol e acetoxipinosresinol (Brenes et al., 1999). Por último, podem ser encontradas diferentes tipos de flavonas, tais como apigenina ou luteolina (Servili et al., 2004).

2.1.2.4. Fosfolípidos

Fosfolípido é o termo genérico que se refere a qualquer lípido que contenha um grupo fosfato. Estão identificados como tendo atividade antioxidante. O ácido oleico é o ácido gordo predominante na estrutura dos fosfolípidos, e o seu padrão de ácidos gordos é similar à dos triglicéridos (Sánchez et al., 2001).

A fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina estão identificadas como sendo os principais fosfolípidos encontrados no azeite (Alter & Gutfinger, 1982). Mais recentemente, o ácido fosfático e o fosfatidilglicerol, foram identificados e quantificados por cromatografia líquida – espectroscopia de massa (GC-MS) (Boukhchina et al., 2004).

2.1.2.5. Ceras

Os ésteres de álcoois alifáticos de cadeia longa, vulgarmente chamados de ceras, contêm até 58 átomos de carbono, afetando as suas propriedades físicas, como o seu peso molecular elevado, ponto de fusão superior a 70°C, entre outros (Ramírez-Tortosa et al., 2006). As principais ceras detetadas em azeite têm números de carbono par, ou seja, são os ésteres de ácido oleico ou palmítico de C₃₆ a C₄₆ átomos de carbono (Reiter & Lorbeer, 2001).

As ceras estão presentes na pele das azeitonas evitando a perda de água. Elas são abundantes no óleo de bagaço de azeitona e em azeite lampante. A elevada acidez dos azeites faz aumentar a quantidade de ceras, uma vez que ocorre esterificação de álcoois alifáticos com ácidos gordos livres (Ramírez-Tortosa et al., 2006). Desta forma, este parâmetro pode ser usado como um critério para diferenciação das várias classificações de azeite. A quantidade máxima permitida em azeites virgem extra é de 250 mg/kg (Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003). O seu teor é afetado pela cultivar, ano de colheita, qualidade da matéria-prima e condições de processamento (Boskou et al., 2006).

2.1.2.6. Clorofilas e Carotenóides

Vários componentes são responsáveis pela cor dos azeites. As clorofilas a e b (figura 4), e os seus produtos de oxidação, feofitinas a e b, são responsáveis pela cor esverdeada. Os carotenóides (luteína, β-caroteno, violaxantina e neoxantina, representados na figura 5), quimicamente chamados de terpenos são derivados do ácido mevalónico, e responsáveis pela cor amarelada dos azeites. A quantidade destes compostos é influenciada pela cultivar, índice de maturação, zona de produção, sistema de extração, e condições de armazenamento. Assim, há autores que consideram os pigmentos como um índice de qualidade, embora não exista nenhum método padronizado para a sua medição (Boskou et al., 2006; Ramírez-Tortosa et al., 2006; Sánchez et al., 2001).

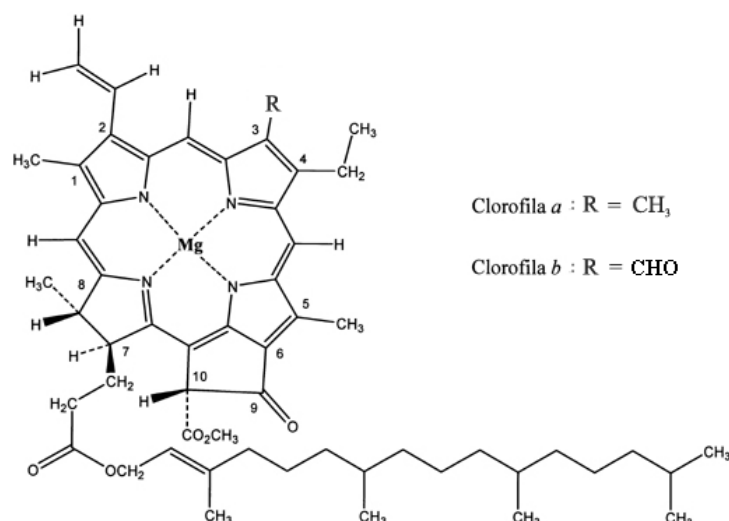


Figura 4 – Estrutura química da clorofila (a e b).

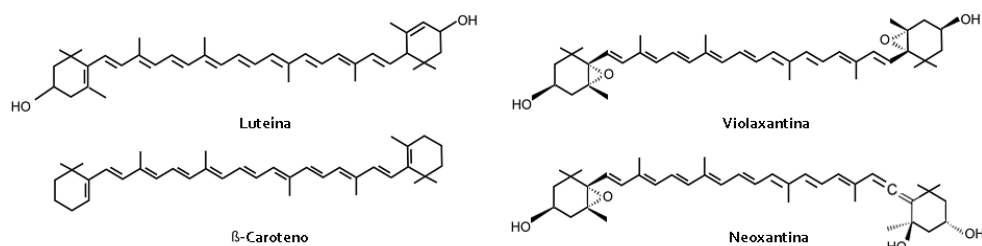


Figura 5 – Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.

2.1.2.7. Álcoois Alifáticos e Triterpénicos

Estes tipos de álcoois encontram-se na forma livre e esterificada. Os mais importantes são os álcoois gordos e os álcoois diterpénicos (Reiter & Lorbeer, 2001).

Os álcoois gordos são compostos lineares saturados com mais de 16 átomos de carbono. Os principais álcoois gordos presentes no azeite são o dicosanol (C₂₂), tetracosanol (C₂₄), hexacosanol (C₂₆) e octacosanol (C₂₈). Álcoois com número ímpar de carbonos estão presentes em quantidades vestigiais. Estes compostos não excedem, geralmente, os 350 mg/kg de azeite. O teor de álcoois gordos é afetado pela cultivar, condições ambientais, índice de maturação e processamento (Sánchez et al., 2001).

Álcoois como o fitol e o granilgeraniol são diterpenóides acíclicos presentes na fração de álcoois alifáticos do azeite sob a forma livre e esterificada (Reiter & Lorbeer, 2001).

Dois dos principais álcoois triterpênicos identificados são os diálcoois triterpênicos eritrodíol e uvaol. Os álcoois triterpênicos variam de 500 a 3000 mg/kg (Ramírez-Tortosa et al., 2006).

Os teores de eritrodíol e uvaol são usados como parâmetros de qualidade. Um teor muito elevado destes diálcoois triterpênicos é um indicativo de azeites obtidos por solventes (Angerosa et al., 2006). Segundo o Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003, o limite máximo de eritrodíol e uvaol é de 4,5% para todas as categorias comerciais de azeite.

2.1.2.9. Esteróis

Os compostos esterólicos são álcoois tetracíclicos biossintetizados a partir do esqualeno. Os esteróis estão presentes no azeite como álcoois livres e como ésteres de ácidos gordos (Firestone, 2005). O principal esterol presente no azeite é o β -sitosterol (figura 6), em menores quantidades temos o estigmasterol, colesterol, 24-metileno-colesterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol, Δ^7 -estigmastenol e Δ^7 -avenasterol (Sánchez et al., 2001).

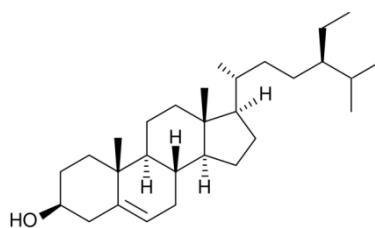


Figura 6 – Estrutura química do β -sitosterol.

A quantidade de esteróis pode ser usada para identificar a origem e também a pureza de um azeite. A diminuição dos esteróis durante o armazenamento tem sido associada ao aumento do valor de peróxidos (Ramírez-Tortosa et al., 2006). O Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003 estabelece os limites para a composição esterólica dos azeites:

Quadro 2 – Limites à composição esterólica em azeites.

Composição esterólica	Concentração
<i>Colesterol</i>	≤ 0,5%
<i>Brassicasterol</i>	≤ 0,1%
<i>Campesterol</i>	≤ 4,0%
<i>Estigmasterol*</i>	< 4,0%
<i>β-sitosterol</i> ^(a)	≥ 93,0%
<i>Δ-7-estigmasterol</i>	≤ 0,5%
<i>Esteróis totais</i>	≥ 1000mg/kg

(a) Soma de Δ-5,23-estigmastadienol + clerosterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ-5-avenasterol + Δ-5,24-estigmastadienol.

* Não se aplica ao azeite lampante.

2.1.2.10. Compostos Voláteis e Aromáticos

Os compostos voláteis são retidos pelos azeites durante o seu processo de extração mecânica. Os compostos voláteis, estimulando os recetores olfativos, são responsáveis pelo aroma do azeite (Angerosa et al., 2004). O azeite apresenta um aroma particular devido à grande quantidade de compostos aromáticos de diversa natureza. Estes compostos são produzidos por ação de enzimas lipoxigenase ou álcool desidrogenase, que atuam durante o esmagamento dos frutos e se incorporam na fase líquida da pasta das azeitonas no processo de termobatedura, formando aldeídos e álcoois. A sua quantidade varia com a região geográfica, cultivar, índice de maturação, condições ambientais, e processo de extração, em particular as fases da moenda, termobatedura e tipo de centrifugação utilizado (Sánchez et al., 2001).

Os azeites contêm aproximadamente 280 compostos voláteis (Boskou et al., 2006). Estão identificados como sendo hidrocarbonetos (mais de 80 compostos), álcoois (45), aldeídos (44), cetonas (26), ácidos (13), ésteres (55), éteres (5), derivados de furano (5), derivados de tiofeno (5), piranonas (1), tióis (1) e um composto de pirazina. Apesar do grande número de compostos, de acordo com Boskou et al. (2006) apenas 67 são verdadeiramente responsáveis pelo aroma dos azeites, uma vez que muitos deles não estão em quantidade suficiente para serem detetados. Destes, 20 são responsáveis por defeitos no sabor do azeite (Boskou et al., 2006). Alguns dos compostos aromáticos conhecidos em azeite são referidos no quadro 3.

Quadro 3 – Alguns compostos aromáticos encontrados em azeite.

Aldeídos	Cetonas	Ésteres
Etanal	Pentano-3-ona	Acetato de metilo
Propanal	1-Penteno-3-ona	Acetato de butilo
2-Metil-propanal	1-Octeno-3-ona	Acetato de etilo
Hexanal		Propanoato de etilo
Heptanal	Álcoois	Butirato de etilo
Octanal	Etanol	Isobutirato de etilo
Nonanal	Pentano-1-ol	2-metilbutirato de etilo
Decanal	Hexano-1-ol	3-metilbutirato de etilo
2-Metilbutanal	2-Metil-propano-1-ol	Acetato <i>cis</i> -3-Hexenilo
3-Metilbutanal	2-Metilbutano-1-ol	Acetato de hexilo
2-Metil-2-butenal	<i>cis</i> -2-Penteno-1-ol	Acetato de isoamilo
<i>trans</i> -2-Pentenal	<i>trans</i> -3-Hexeno-1-ol	2-metilbutirato de metilo
<i>cis</i> -2-Pentenal	<i>cis</i> -3-Hexeno	Decanoato de metilo
<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>trans</i> -2-Hexeno-1-ol	Nonanoato de metilo
<i>cis</i> -2-Hexenal	<i>cis</i> -2-Hexeno-1-ol	
<i>trans</i> -3-Hexenal	1-Penteno-3-ol	Outros
<i>cis</i> -3-Hexenal		Metilbenzeno
2-Octenal	Ácidos	Etilbenzeno
<i>cis</i> -2-Nonenal	Ácido etanóico	Etilfurano
<i>trans</i> -2-Nonenal	Ácido propanoico	Dimetil sulfureto
2-Decenal	Ácido butanoico	Dipropil disulfeto
2,4-Hexadienal	Ácido pentanoico	Ciclopropano
2,4-Heptadienal	Ácido hexanoico	
2,4-Nonadienal	Ácido 3-metilbutanóico	
2,6-Nonadienal	Ácido 3-Metilbutírico	
2,4-Decadienal		
Benzaldeído		
Fenilacetaldeído		

Fonte: Ramírez-Tortosa et al., 2006

2.2. AZEITES AROMATIZADOS

O azeite tem sido, ao longo dos séculos, amplamente utilizado na cozinha mediterrânica, sendo apreciado pelas suas características organoléticas e nutricionais, reconhecidamente comprovadas (Moldão-Martins et al., 2004). Os azeites aromatizados podem ser considerados uma simples moda, mas são uma prática antiga nascida no mediterrâneo com a finalidade de evitar, ou mesmo disfarçar, problemas de reações de degradação oxidativa. A aromatização do azeite com plantas, especiarias ou ervas aromáticas pretende melhorar o valor nutricional, modificar as características sensoriais

e, por vezes, aumentar o tempo de prateleira (Antoun & Tsimidou, 1997). Os azeites resultantes adquirem desta forma o sabor correspondente do aromatizante, e são usados para confeção de pratos de culinária e saladas (Gambacorta et al., 2007).

Os consumidores do Norte da Europa, EUA e Canadá têm introduzido lentamente os azeites na sua dieta, com o intuito de prevenir doenças cardiovasculares. Estes consumidores não estando familiarizados com as características organoléticas dos azeites, estão dispostos a consumir azeites aromatizados como forma de melhorar o flavor do mesmo (Antoun & Tsimidou, 1997). Pelas razões anteriores, por ser versátil, e existirem uma vasta gama de sabores, o azeite aromatizado tornou-se num molho popular utilizado por consumidores tradicionais e não tradicionais de todo o mundo.

2.2.1. Definição de Azeites Aromatizados

De acordo com o Regulamento (CE) n° 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003 que altera o Regulamento (CEE) n° 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, um Azeite Virgem Extra é um óleo que obedece a uma série de parâmetros químicos (acidez $\leq 0,8\%$, índice de peróxido $\leq 20\text{mEq. O}_2/\text{kg}$, $K_{232} \leq 2,50$, $K_{270} \leq 0,22$), é livre de defeitos e com mediana de frutado superior a zero, possuindo um aroma e sabor irrepreensível. Excluem-se desta categoria, os óleos obtidos a partir das sementes por métodos químicos, com o uso de solvente de extração ou métodos de reesterificação, e aqueles misturados com outros ingredientes ou óleos provenientes de outras fontes (Baiano et al., 2010). Assim, por definição, os azeites aromatizados não são considerados Virgem Extra.

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI), o azeite aromatizado é encarado como sendo um tempero, desta forma os azeites aromatizados podem ser chamados de, por exemplo, “Tempero à base de azeite virgem extra aromatizado com especiarias ou ervas”. No entanto na prática, apesar de não poderem ser chamados desta forma, o que dizem os rótulos é “Azeite... aromatizado com...”. (Baiano et al., 2010).

2.2.2. Ervas e Especiarias Utilizadas em Azeites Aromatizados

As especiarias são usadas para preservação, dar sabor, cor e aroma a alimentos ou bebidas. As especiarias provêm de várias partes da planta: casca, botões, flores, frutos, folhas, rizomas, raízes, sementes, estigmas e estilete ou parte aérea das plantas inteiras.

O termo 'erva' é utilizado como um subconjunto de especiarias e refere-se a plantas com folhas aromáticas.

No mercado é possível encontrar uma gama muito ampla de azeites aromatizados. Segundo Baiano et al., 2010, os azeites podem ser aromatizados com:

- ▲ vegetais (alho, cebola, pimenta-malagueta, pimentão, tomate seco);
- ▲ ervas (alecrim, orégãos, manjerição, sálvia, tomilho, funcho, zimbro, estragão);
- ▲ especiarias (cravo da índia, noz-moscada, gengibre, pimenta-preta, louro);
- ▲ cogumelos (trufas);
- ▲ frutos (limão, laranja, tangerina, maçã, banana);
- ▲ frutos secos (amêndoa, avelã, pinhão);
- ▲ aromas (por exemplo, baunilha).

Existem ainda no mercado azeites com outros agentes aromatizantes a título de exemplo referem-se os azeites aromatizados com algas, ou os azeites enriquecidos com partículas de ouro.

Neste trabalho foram utilizados como aromatizantes, o alho, folhas de louro, pimenta-malagueta, orégãos e pimenta preta. De seguida far-se-á uma breve referência a cada um dos aromatizantes utilizados.

2.2.2.1. Alho

O alho (*Allium sativum* L.) pertencente à família das Liliaceae, é amplamente consumido como vegetal e especiaria, mas também como um medicamento popular para a cura de várias doenças. Os sabores fortes e invulgares das espécies do género *Allium* e as suas propriedades medicinais têm atraído a atenção de químicos e fisiologistas de plantas. A maioria dos seus efeitos profiláticos e terapêuticos são atribuídos a algumas moléculas biologicamente ativas com propriedades antibacterianas e antibióticas, mas também a compostos antioxidantes e voláteis comuns no alho (Antoun & Tsimidou, 1997; Haciseferoğulları et al., 2005).

2.2.2.2. Louro

O louro (*Laurus nobilis* L.) pertencente à família das Lauraceae, é uma das especiarias mais amplamente utilizados na culinária em todos os países ocidentais. A atividade biológica e fitoquímica do *L. nobilis* tem sido amplamente estudada e é utilizado como medicamento para o tratamento e prevenção de várias doenças. As

folhas de louro são tradicionalmente utilizados por via oral para tratar os problemas gastrointestinais, pois possuem estimulantes aromáticos e narcóticos (Fang et al., 2005; Barla et al., 2007).

2.2.2.3. Malagueta

A malagueta ou também chamada pimenta-malagueta pertence à família Solanaceae, juntamente com outras culturas, como tomate, beringela e batata. O género pimenta divide-se em 25 espécies diferentes, entre elas a pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens* L.). Esta divisão deve-se a características florais, tais como a forma do cálice e o número e orientação das flores por nó. Os frutos da *C. frutescens* são fonte de metabólitos com propriedades medicinal, por exemplo, os carotenóides (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides, tocoferóis e tocotrienóis. Os efeitos biológicos devem-se a estes compostos que são antioxidantes (Wahyuni et al., 2011).

2.2.2.4. Orégãos

O *Origanum vulgare* L. (orégãos) pertencente à família das Lamiaceae, é amplamente utilizada como erva aromatizante na cozinha mediterrânica. Devido às suas propriedades químicas e biológicas tem sido utilizado na medicina tradicional. Vários estudos mostraram que os orégãos têm inúmeras propriedades, tais como antibacteriana, antifúngica, antimutagénica e antioxidante. Na indústria alimentar, estas ervas têm sido utilizadas para prolongar o tempo de prateleira de determinados géneros alimentícios (Figiel et al., 2010; Gulluce et al., 2012).

2.2.2.5. Pimenta Preta

Da família das Piperaceae provêm os grãos da pimenta preta (*Piper nigrum* L.). É um tempero natural, amplamente cultivada e utilizado em todo o mundo, que possui interessantes propriedades farmacológicas e toxicológicas com aplicação clínica. O seu principal componente é a piperina que contribui para a sua pungência. Este alcaloide tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, por outro lado pode potenciar os efeitos mutagénicos e carcinogénicos, como por exemplo quando reage com os nitritos presentes nos alimentos (Reddy et al., 2004; Polovka et al., 2006).

2.2.3. Propriedades dos Aromatizantes

A adição de especiarias ao azeite tem sido utilizada ao longo dos séculos, e os azeites aromatizados são usados para realçar diferentes tipos de pratos culinários. A adição de especiarias ao azeite para além de melhorar as suas propriedades sensoriais e nutricionais tem impacto sobre o prolongamento do tempo de prateleira do azeite (Baiano et al., 2010). O azeite virgem extra é provido de substâncias com efeitos sadios: ácidos gordos insaturados (ácido oleico), antioxidantes naturais como clorofilas, carotenóides, α -tocoferol e compostos fenólicos. Aos compostos extraídos de plantas aromáticas geralmente são atribuídas interessantes propriedades antioxidantes (quadro 4). Como consequência, a adição de especiarias ao azeite melhora as suas propriedades nutricionais e efeitos benéficos ao nível da saúde, particularmente em termos de prevenção de oxidação. O oxigénio reativo e o azoto são continuamente produzido no corpo humano. Estes são controlados por enzimas endógenas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase) e no caso de uma falha nos mecanismos de defesa ou à exposição a substâncias oxidantes externas, podem ocorrer danos ao nível das biomoléculas (DNA, lípidos, proteínas). Estes danos estão associados a um maior risco de cancro, doenças cardiovasculares, entre outras doenças crónicas. Assim, a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes podem prevenir o risco associado a estas doenças (Stanner et al., 2007). De todos os antioxidantes, os polifenóis ostentam uma vasta gama de efeitos biológicos (antibacteriano, anti-inflamatório, antialérgico, hepatoprotetor, antitrombótico, ação antiviral, anticancerígeno e vasodilatador) atribuídos genericamente à atividade antioxidante (Middleton et al., 2000). Para além das propriedades nutricionais benéficas à saúde, a aromatização do azeite tem impacto sobre o tempo de prateleira do produto. Desta forma, os antioxidantes têm sido amplamente utilizados em óleos e gorduras, a fim de impedir a sua oxidação e a consequente produção de sabores indesejáveis, uma vez que a oxidação lipídica pode diminuir o valor nutricional dos alimentos e tem efeitos indesejáveis sobre o nosso organismo. O problema é peculiarmente valorizado na indústria com vista a aumentar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Desta forma, existe um interesse crescente nas especiarias como fonte de antioxidantes naturais.

No quadro 4 descrevem-se alguns dos compostos antioxidantes e voláteis encontrados nas ervas e especiarias utilizados para aromatizar os azeites testados.

Quadro 4 – Lista de compostos antioxidantes e voláteis aromáticos isolados em amostras de ervas e especiarias.

	C. antioxidantes	C. aromáticos voláteis
Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	Alanina, alicina, aliína, alixina, alil-mercaptano, α -tocoferol, apigenina, ác. ascórbico, β -caroteno, β -sitosterol, ác. cafeico, campesterol, ác. clorogénico, clorofila, colesterol, citral, cisteína, ác. ferúlico, glutationa, histidina, ionol, kaempferol, lignina, manganês, metionina, miricetina, ác. mirístico, ác. <i>p</i> -cumárico, ác. palmítico, ác. pentadecanóico, ác. fítico, quercetina, riboflavina, rutina, ác. salicílico, selénio, ác. sinápico, estigmasterol, sacarose, taurina, triptofano, ác. vanílico.	α -felandreno, citral, sulfureto de dimetilo, geraniol, hexadecanol, linalol, ác. oleico, ác. palmítico, treonina, valina
Louro (<i>Laurus nobilis</i> L.)	(+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, 4-terpineol, β -sitosterol, boldina, ác. cafeico, campesterol, canfeno, carvacrol, citral, cianidina, eugenol, γ -terpineno, isoquercitrina, kaempferol, ác. láurico, manganês, manitol, metil-eugenol, mirceno, ác. <i>p</i> -cumárico, ác. palmítico, proantocianidinas, quercetina, quercitrina, rutina, terpinen-4-ol, terpinoleno, timol	1,8-cineol, 4-terpineol, α -felandreno, α -pineno, α -terpineno, α -terpineol, benzaldeído, β -pineno, borneol, canfeno, carvacrol, carvona, cariofileno, ác. cinâmico, <i>cis</i> -3-hexenol, citral, Δ^3 -careno, estragol, eugenol, ác. fôrmico, γ -terpinene, geraniol, geranyl acetato, hexanal, hexanol, limoneno, linalol, cinamato de metilo, metil-eugenol, mirceno, nerol, ác. oleico, <i>p</i> -cimeno, ác. palmítico, piperidina, áci. propiónico, terpinoleno, timol, <i>trans</i> -2-hexenal
Malagueta (<i>Capsicum frutescens</i> L.)	Alanina, ác. ascórbico, β -caroteno, β -sitosterol, ác. cafeico, campesterol, capsaicina, capsantina, ác. clorogénico, ác. ferúlico, hesperidina, histidina, kaempferol, ác. láurico, luteína, manganês, metionina, mirceno, ác. mirístico, ác. <i>p</i> -cumárico, ác. palmítico, ác. pentadecanóico, quercetina, riboflavina, rutina, escopoletina, estigmasterol, terpinen-4-ol, tocoferol, triptofano	1,8-cineol, α -felandreno, α -terpineol, benzaldeído, β -pineno, capsaicina, carvona, cariofileno, ác. cinâmico, ác. cítrico, Δ^3 -careno, ác. hexanóico, ác. isovalérico, limoneno, metil-fenilacetato, mirceno, ác. nonanóico, ác. octanóico, ác. oleico, <i>p</i> -metil-acetofenona, ác. palmítico, pulegona, ác. esteárico, treonina, ác. valérico, valina

Orégãos (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Canfeno, carvacrol, γ -terpineno, linalil acetato, mirceno, terpinen-4-ol, terpinoleno, timol	1,8-cineol, α -pineno, α -terpineno, α -terpineol, β -pineno, canfeno, carvacrol, Δ^3 -careno, γ -terpinene, limoneno, linalil acetato, metil-2-metil-butirato, mirceno, <i>p</i> -cimeno, terpinoleno, timol
Pimenta preta (<i>Piper nigrum</i> L.)	α -tocoferol, ác. ascórbico, β -caroteno, β -sitosterol, ác. cafeico, campesterol, canfeno, carvacrol, citral, eugenol, γ -terpinene, hiperosídeo, isoquercitrina, kaempferol, ác. láurico, linalil acetato, manganês, metil-eugenol, mirceno, ác. mirístico, miristicina, ác. <i>p</i> -cumárico, ác. palmítico, piperina, quercetina, quercitrina, riboflavina, rutina, estigmasterol, terpinen-4-ol, terpinoleno, ubiquinona	1,8-cineol, α -felandreno, α -pineno, α -terpineno, α -terpineol, ác. benzóico, β -pineno, borneol, canfeno, carvacrol, carvona, cariofileno, álcool cariofileno, ác. cinâmico, citral, citronelal, citronelol, acetato de citronelilo, d-limoneno, Δ^3 -careno, eugenol, γ -terpineno, geranyl acetato, ác. hexanóico, isopulegol, limoneno, linalol, linalil acetato, cinamato de metilo, metil-eugenol, mirceno, miristicina, nerolidol, ác. oleico, <i>p</i> -cimeno, <i>p</i> -metil-acetofenona, ác. palmítico, ác. fenilacético, piperidina, piperina, ác. esteárico, terpinoleno

Fonte: USDA (2007) – (<http://www.ars-grin.gov/duke/>)

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

No presente trabalho foi utilizado um lote de azeite virgem extra produzido pela Cooperativa de Olivicultores de Vila Flor e Ansiães. Os aromatizantes (alho, louro, malagueta, orégãos e pimenta) foram comprados num mercado local. Cada um dos agentes aromatizantes foi introduzido individualmente numa garrafa de cor âmbar com capacidade de 500 mL, sendo posteriormente as garrafas enchidas com o azeite e rolhadas. Em seguida, as garrafas foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar durante um período de três meses antes de se proceder a qualquer avaliação. Para cada um dos agentes aromatizantes, e para o controlo (sem qualquer agente) foram preparadas 6 garrafas, considerando-se cada garrafa como uma repetição, totalizando 36 garrafas de azeite.

Antes das análises, o azeite foi filtrado com papel de filtro na presença de sulfato de sódio anidro, por forma a remover possíveis impurezas e humidade que pudessem estar presente. Após filtração as amostras foram acondicionadas à temperatura de refrigeração em garrafas de cor âmbar de modo a evitar a ocorrência de fenómenos oxidativos, decorrendo as análises no menor período de tempo possível. Cada uma das determinações foi efetuada em duplicado ou em triplicado de acordo com o procedimento analítico em questão.

3.2. PARÂMETROS DE QUALIDADE

3.2.1. Acidez

A determinação da acidez foi executada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a seguinte metodologia: a toma de amostra para cada ensaio foi de, aproximadamente, 5,0 g, independentemente da acidez presumida; num matraz, a solução (1:1) etanol/éter etílico e as tomas de azeite foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína, até aparecimento de cor rosada ténue e persistente. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. A acidez, em percentagem de ácido oleico livre na amostra, foi determinada utilizando a seguinte equação:

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

onde:

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

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

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

m - massa da amostra em grama.

3.2.2. Índice de Peróxido

A determinação do índice de peróxido está de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a seguinte metodologia: cada toma de amostra, de aproximadamente 1,2 g, foi dissolvida em ácido acético glacial (15 mL) e clorofórmio (10 mL), com uma solução de iodeto de potássio (1 mL). Após dissolução dos reagentes, tapa-se o matraz, e armazena-se (5 min.) à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por último, acrescenta-se 75 mL de água destilada, uma solução de amido (1g/100mL) como indicador e titula-se o iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N. Cada amostra foi analisada em duplicado e foi realizado um ensaio em branco. Os valores de índice de peróxido foram calculados segundo a fórmula:

$$\text{Índice de Peróxido (mEq. O}_2\text{/kg)} = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

onde:

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

N - normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio;

m - massa da amostra em grama.

3.2.3. Espectrofotometria no Ultravioleta

A análise da absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a

seguinte metodologia: em aproximadamente 0,6 g de toma de amostra foram dissolvidas em 10 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), determinando-se em seguida, em “cuvettes” de quartzo de percurso ótico de 1cm, o coeficiente de extinção da solução nos comprimentos de onda prescritos (232 a 276nm) em relação ao iso-octano no seu estado puro. As leituras de absorvância foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ 10. Os coeficientes de extinção a 232 nm, 270 nm e ΔK foram calculados da seguinte forma:

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

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

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

onde:

A_{232} , A_{266} , A_{270} e A_{274} são absorvâncias;

c - concentração do azeite em g / 100 mL;

l - percurso ótico (1 cm).

3.3. ÁCIDOS GORDOS

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. Cada amostra foi analisada em triplicado. Os ácidos gordos, assim como os seus ésteres metílicos, foram avaliados recorrendo à transesterificação direta a frio, com hidróxido de potássio metanólico e extração com n-heptano.

O perfil em ácidos gordos foi determinado com um cromatógrafo gasoso (GLC) Chrompack, modelo CP-9001, com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split de 1:50, injetor com detetor de ionização por chama (FID) e amostrador automático modelo Chrompack CP-9050. A separação dos ácidos gordos foi efetuada numa coluna WCOT (Wall Coated Open Tubular) de sílica fundida com fase estacionária CP Sil-88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25

mm x 0,19 µm. Foi utilizado hélio como gás de arrasto. A pressão interna era de 140kPa. As temperaturas do injetor, da coluna e do detetor eram 230°C, 185°C e 250°C, respetivamente. A recolha e o tratamento dos dados foram realizados pelo programa CP Maitre Chromatography Data System, Version 2.5 (Chrompack International B.V.).

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

3.4. TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

A concentração de vitamina E foi obtida por determinação do teor de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), segundo a norma ISO 9936:2006.

Os padrões de tocoferóis e tocotrienóis foram comprados à Calbiochem[®] (La Jolla, San Diego, CA, EUA) e Sigma-Aldrich[®] (Espanha), ao passo que o padrão interno 2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-2H-cromen-6-ol (tocol) era da Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, EUA).

Uma quantidade de 50 mg de azeite foi filtrado e misturado com uma quantidade apropriada de solução de padrão interno (tocol) num volume de 1,5 mL de n-hexano e homogeneizado por agitação. A preparação das amostras foi realizada no escuro com tubos revestidos de folha de alumínio. A mistura foi centrifugada durante 5 min. a 13000 g (força G) e o sobrenadante analisado por HPLC.

O cromatógrafo consistia num sistema integrado Jasco (Japão), equipado com uma unidade de dados Jasco LC-NetII/ADC, uma bomba inteligente PU-1580, uma unidade de gradiente quaternária LG-1580-04, um desgaseificador DG-1580-54 Four line, e um detetor de fluorescência FP-920 ($\lambda_{exc} = 290$ nm e $\lambda_{em} = 330$ nm). A separação cromatográfica foi conseguida através de uma coluna Supelcosil[™] LC-SI (3µm) 75 × 3,0 mm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), operando à temperatura ambiente (23°C). Uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (97,5:2,5) foi utilizada como eluente num caudal de 0,7 mL/min. Os dados foram analisados com o controle ChromNAV Center, JASCO Chromatography Data Station (Japão).

Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões autênticos, por coeluição e pelo espectro de UV. A quantificação foi baseada no método do padrão interno utilizando a resposta do sinal de fluorescência.

3.5. TEOR EM FENÓIS TOTAIS

A composição em fenóis totais foi determinada pelo método utilizado por Capannesi et al. (2000), com algumas modificações. Para a reta de calibração preparou-se uma solução mãe de ácido cafeico de concentração 2 mg/mL, onde as soluções padrão diluídas se encontravam num intervalo de concentrações de 0,04 a 0,18 mg/mL. Após preparação das soluções, adicionamos para tubos de 10 mL, 1 mL dessa solução, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau e 1 mL de uma solução de carbonato de sódio (7,5%), perfazendo-se o tubo com água desionizada. A mistura foi refrigerada durante a noite (≈ 12 h), após a qual foi centrifugada e efetuadas as leituras a 725 nm.

Para a extração dos fenóis totais pesaram-se para cada amostra 2,5 g de azeite, que foram dissolvidos em 2,5 mL de n-hexano e extraídos três vezes por centrifugações de 5 minutos a 5000 rpm com 2,5 mL de uma mistura de 80% de metanol e 20% de água (v/v). A cada mL de extrato adicionaram-se 1 mL de Folin-Ciocalteau, 1 mL de Na_2CO_3 (7,5%) e perpez-se com água desionizada até ao volume de 10 mL. A mistura foi refrigerada durante a noite (≈ 12 h), após a qual foi centrifugada e efetuadas as leituras num espectrofotómetro UV/Visível modelo GenesysTM a 725 nm.

3.6. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

3.6.1. Atividade Sequestradora do Radical DPPH (DPPH[•])

A avaliação da atividade sequestradora realizada pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) foi monitorizada de acordo com a metodologia descrita por Hatano et al. (1988). O DPPH[•], na nomenclatura IUPAC chamado de di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium, é um radical livre estável que aceita um eletrão ou um radical de hidrogénio para se tornar uma molécula diamagnética estável e, desta forma, reduzido na presença de um antioxidante.

Para a avaliação da atividade antioxidante várias concentrações de amostras de extratos (0,3 mL) foram misturados com 2,7 mL de solução metanólica contendo

radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi agitada vigorosamente e deixou-se repousar no escuro até obtenção de valores de absorção estáveis. A redução do radical DPPH foi medida por monitorização contínua da diminuição da absorção a 517 nm.

3.6.2. Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS^{•+})

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

Assim, para esta técnica, o ABTS^{•+} (7mM) foi enriquecido com K₂S₂O₈ (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas. A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma absorvância a $\lambda = 734$ nm de $0,70 \pm 0,02$. A reação realizou-se diretamente na cuvete de quartzo, com a adição de 2 mL de ABTS^{•+} (Branco) e de 100 μ L de amostra ou padrão. Os valores de absorvância são inversamente proporcionais à quantidade de antioxidantes presentes nas nossas amostras. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys[™].

3.7. ESTABILIDADE OXIDATIVA

A estabilidade à oxidação foi avaliada pelo método de condutividade (Rancimat 743, Methrom Ltd., Suíça). É um processo que consiste em fazer borbulhar uma corrente de ar, filtrada, limpa e seca (20 L/h) através de uma toma de amostra (3,0 g) aquecida a $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. Os compostos de oxidação formados ao longo do tempo, mais polares que os triglicéridos, tais como hidroperóxidos, álcoois e compostos carbonílicos, são arrastados pelo fluxo de ar e borbulham posteriormente numa solução aquosa. Nesta solução está imerso um eléctrodo que mede a sua condutividade. O aparelho efetua as análises automaticamente e em contínuo, só podendo interromper-se a operação quando, para cada amostra, a condutividade medida atinge o seu máximo (300 μ S/cm).

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

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são as médias de pelo menos duas repetições por cada garrafa aromatizada, salvo indicação em contrário.

3.8.1. Análise de Variância

A análise de variância dos parâmetros avaliados foi analisada pelo software SPSS, versão 19,0 (IBM Corporation, New York, EUA). O cumprimento dos requisitos da ANOVA, nomeadamente a distribuição normal dos resíduos e a homogeneidade de variâncias, foram avaliados por meio de testes Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors (se $n > 50$) ou testes Shapiro-Wilk (se $n < 50$), e os testes de Levene, respectivamente. Todas as variáveis dependentes foram analisadas usando uma ANOVA one-way com ou sem correção de Welch, dependendo se o requisito da homogeneidade de variâncias foi cumprido ou não. Os efeitos da adição de aromatizantes ao azeite sobre os parâmetros de qualidade (acidez, índice de peróxido, K_{232} , K_{270} e ΔK), perfil de ácidos gordos, teor de tocoferóis e tocotrienóis, teor em fenóis totais, estabilidade oxidativa e atividade sequestradora de radicais DPPH e ABTS dos azeites aromatizados foram o principal fator estudado. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Tukey, pois variâncias iguais poderiam ser assumidas. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros estudados, as médias são comparadas pelo teste de Dunnett T3, pois variâncias iguais não poderiam ser assumidas. Todos os testes estatísticos foram realizados em um nível de significância de 5%.

3.8.2. Análise de regressão

A análise de regressão, utilizando o Excel da Microsoft Corporation, foi utilizada entre os azeites aromatizados e a atividade sequestradora de radicais DPPH e ABTS, teor em fenóis totais estabilidade oxidativa e total de vitamina E.

3.8.3. Análise de componentes principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para reduzir o número de variáveis nos azeites aromatizados (14 variáveis – acidez, índice de peróxido, K232, K270, K, fenóis totais, atividade sequestradora de radicais DPPH, atividade sequestradora de radicais ABTS, estabilidade oxidativa, α -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocoferol, γ -tocoferol e total de vitamina E) para um menor número de novas variáveis derivadas (componente principal ou fatores) que adequadamente resumem a informação original, isto é, o efeito da adição de especiarias ao azeite. Além disso, permitiu reconhecer padrões nos dados, projetando-os num espaço multidimensional, utilizando as novas variáveis derivadas como dimensões. A PCA foi realizada usando o software SPSS, versão 19,0 (IBM Corporation, New York, EUA).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PARÂMETROS DE QUALIDADE

De acordo com o Regulamento (CE) nº 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003, um azeite virgem extra é uma gordura líquida que obedece a uma série de parâmetros químicos e sensoriais (acidez $\leq 0,8\%$; índice de peróxido $\leq 20\text{mEq. O}_2/\text{kg}$; $K_{232} \leq 2,50$; $K_{270} \leq 0,22$; $\Delta K \leq 0,01$; isento de defeitos sensoriais e mediana do frutado superior a zero).

No quadro 5 são apresentados os valores médios resultantes das determinações efetuadas para a acidez, índice de peróxido e espectroscopia no ultravioleta, aos azeites controlo e aromatizados. Estes dados demonstram a elevada qualidade do azeite testado, no entanto, é de realçar o facto de estarmos a trabalhar com azeites aromatizados, e que de acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI) não podem ser classificados de azeite virgem extra, mas de por exemplo, “Tempero à base de azeite virgem extra aromatizado com especiarias”

Quadro 5 – Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico); índice de peróxido ($\text{mEq. O}_2/\text{Kg}$); K_{232} ; K_{270} e ΔK] do azeite com e sem adição de aromatizantes (média \pm desvio padrão).

	Acidez	IP	K_{232}	K_{270}	ΔK
Controlo	$0,6 \pm 0,03$ a	$6,57 \pm 0,22$ b	$2,65 \pm 0,15$ c	$0,14 \pm 0,01$ a	$-0,004 \pm 0,001$ a
Alho	$0,8 \pm 0,03$ b	$4,36 \pm 0,32$ a	$2,11 \pm 0,12$ a	$0,14 \pm 0,01$ a,b	$-0,003 \pm 0,001$ a
Louro	$0,6 \pm 0,00$ a	$6,50 \pm 0,29$ b	$2,56 \pm 0,27$ b,c	$0,15 \pm 0,01$ b-d	$-0,004 \pm 0,001$ a,b
Malagueta	$0,6 \pm 0,00$ a	$6,64 \pm 0,00$ b	$2,29 \pm 0,23$ a b	$0,16 \pm 0,01$ c,d	$-0,007 \pm 0,003$ b
Orégãos	$0,6 \pm 0,00$ a	$4,56 \pm 0,30$ a	$2,09 \pm 0,12$ a	$0,15 \pm 0,01$ a-c	$-0,004 \pm 0,001$ a
Pimenta	$0,6 \pm 0,00$ a	$6,64 \pm 0,01$ b	$2,30 \pm 0,20$ a,b	$0,16 \pm 0,01$ d	$-0,006 \pm 0,003$ b
<i>p-value</i>	$< 0,001^{(2)}$	$< 0,001^{(2)}$	$< 0,001^{(2)}$	$< 0,001^{(1)}$	$< 0,001^{(2)}$

^{a-d} Os valores médios apresentados em cada coluna, com letras diferentes diferem significativamente, $p < 0,05$

⁽¹⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os parâmetros de qualidade, a partir de uma análise ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Tukey, pois variâncias iguais poderiam ser assumidas ($p > 0,05$ pelo teste de Levene).

⁽²⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os parâmetros de qualidade, a partir de uma análise one-way Welch ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Dunnett T3, pois variâncias iguais não poderiam ser assumidas ($p < 0,05$ pelo teste de Levene).

4.1.1. Acidez

A acidez de um azeite resulta do grau de desagregação dos triacilgliceróis, devido a reações químicas de hidrólise ou lipólise, formando-se desta forma os ácidos gordos livres. Assim, a acidez não tem qualquer relação com o seu sabor, mas com fatores que incluem ataque de pragas e doenças, contacto prolongado da água com o azeite e ainda métodos de colheita, transporte, armazenamento e extração descuidados.

Os valores de acidez dos azeites testados (controlo e aromatizados) encontram-se no intervalo de 0,6 a 0,8% (quadro 5). Segundo o Regulamento Europeu 1989/03, podemos verificar que o azeite aromatizado com alho se encontra no limite do valor de referência para um azeite virgem extra. Desta forma existem diferenças significativas entre o azeite aromatizado com alho e os restantes ($p < 0,001$). Nos trabalhos de Gambacorta et al. (2007), em azeites aromatizados com alho desidratado a acidez mantém-se inalterada. Por seu lado Baiano et al. (2009) concluíram que os azeites aromatizados com alho desidratado, na produção e no armazenamento, apresentaram sempre valores de acidez inferiores aos restantes azeites, incluindo o azeite não aromatizado. É de referir que no presente trabalho não foi utilizado alho desidratado mas sim alho *in natura*, apenas esmagado ligeiramente. Considerando que de acordo com Mariz et al. (2005), o alho possui um teor apreciável em água (na ordem dos 63%), é de supor que a água existente no alho levou à ocorrência de reações enzimáticas ou de hidrólise que sejam responsáveis pelo aumento da acidez.

4.1.2. Índice de Peróxido

Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite. Os azeites são oxidados quando entram em contacto com o oxigénio que pode existir no espaço superior do recipiente e nele se dissolve. Os produtos de oxidação têm um sabor e odor desagradável e podem afetar negativamente o valor nutricional do azeite. Os ácidos gordos essenciais tais como ácido linoleico e linolénico são destruídos, e certas vitaminas solúveis são degradadas.

O azeite controlo apresentou um índice de peróxido de 6,57 mEq.O₂/Kg, sendo que os azeites aromatizados com alho e orégãos tiveram valores de peróxidos relativamente baixos, de 4,36 e 4,56 mEq.O₂/Kg, respetivamente. Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre estes dois aromatizantes e os restantes azeites. Podemos então referir que a adição de alho e orégãos ao azeite retardou a formação de

hidroperóxidos, diminuindo a oxidação do mesmo com o enriquecimento em compostos antioxidantes. Estes efeitos antioxidantes, do alho e dos orégãos, foram mais expressivos do que os relatados por Antoun & Tsimidou (1997) e Gambacorta et al. (2007), no entanto Baiano et al. (2009) nos seus estudos obtiveram para azeites aromatizados com alho valores relativamente baixos de índice de peróxido em comparação com os restantes azeites avaliados. É também de referir que durante a realização do presente estudo, em nenhum dos azeites testados foi excedido o limite fixado pelo Regulamento Europeu 1989/03 (20 mEq.O₂/kg) para a categoria de azeites virgem extra.

4.1.3. Espectroscopia no Ultravioleta

Na avaliação dos coeficientes de extinção específicos (K_{232} e K_{270}), é possível verificar o grau de oxidação do azeite, complementando as observações para o índice de peróxido. Estes coeficientes são indicativos da conjugação de trienos (K_{232}) e da presença de compostos carbonílicos (K_{270}), respetivamente. Os resultados obtidos em ambos os coeficientes de extinção específicos, K_{232} e K_{270} , e no ΔK (entre 268 e 272nm, tal como especificado no Regulamento da Comunidade Europeia EEC/2568/91) são apresentados no quadro 5.

O K_{232} , para além do índice de peróxido, é outro parâmetro relacionado com a presença de produtos de oxidação primária. Este, veio confirmar o que foi dito anteriormente para o índice de peróxido. Se compararmos os valores obtidos em ambos os parâmetros, verificamos que os valores mais baixos são os dos azeites aromatizados com alho e orégãos, existindo diferenças significativas com os outros azeites. Desta forma podemos afirmar que o alho e os orégãos mostraram melhorar a estabilidade oxidativa, comparativamente às outras especiarias.

A adição de malagueta e pimenta ao azeite fez aumentar os produtos secundários da oxidação, avaliadas pelo K_{270} , existindo diferenças significativas entre eles. Os valores foram sempre inferiores ao limite fixado pelo Regulamento 1989/03 para azeites virgens extra (0,22).

Nos diversos estudos realizados, Gambacorta et al. (2007) determinaram que os valores de K_{232} e K_{270} , nos azeites aromatizados com alho, orégãos e malagueta, não sofriam qualquer alteração em comparação com o seu azeite de referência (não aromatizado); recentemente, e mais análogo aos nossos resultados, Baiano et al. (2009)

concluíram que a adição de especiarias aumentava os valores dos coeficientes de extinção específicos, exceto para o azeite aromatizado com alho que obtém os melhores valores de K_{232} e K_{270} ($2,11 \pm 0,12$ e $0,14 \pm 0,01$, respetivamente)

4.2. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS

Todos os detalhes sobre o perfil em ácidos gordos são dados no quadro 6. As amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1989/2003). O ácido oleico (C18:1) foi o ácido gordo mais representativo de entre todas as amostras, variando entre 74,47 e 75,09% dos ácidos gordos totais, com diferenças significativas entre os azeites aromatizados testados. O ácido palmítico (C16:0) foi o segundo mais abundante, seguido de ácido linoleico (C18:2) e ácido esteárico (C18:0).

No que respeita às diferentes frações dos ácidos gordos, verificamos que a adição de aromatizantes diminui os ácidos gordos saturados (SFA), afetando significativamente o ácido palmítico (C16:0), sendo do ponto de vista nutricional um benefício. Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) são estáveis, e neste caso com a adição de aromatizantes sofreram um aumento significativo ($p < 0,001$), o que nos pode levar a acreditar que protegeu o azeite da oxidação. Esta dúvida é dissipada com os valores médios dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) uma vez que todos os azeites aromatizados sofreram quebras em relação ao azeite controlo. Assim, o principal ácido gordo polinsaturado, o ácido linoleico (C18:2), com a adição de aromatizantes no azeite, viu a sua suscetibilidade diminuir face à oxidação, uma vez que as suas ligações duplas insaturadas são bastante instáveis.

A relação entre MUFA + PUFA / SFA foi comparativamente melhor nas amostras com aromatizantes (6,24 no alho, 6,33 no louro, 6,26 na malagueta, 6,28 nos orégãos e 6,26 na pimenta) do que na amostra controlo (6,09). Estes dados indicam que a adição de aromatizantes parece ser mais benéfica que prejudicial.

Quadro 6 – Valores médios do perfil em ácidos gordos do azeite com e sem adição de aromatizantes (média ± desvio padrão).

	Controlo	Alho	Louro	Malagueta	Orégãos	Pimenta	<i>p-value</i>
C 16:0	10,80 ± 0,23 c	10,40 ± 0,18 b	10,19 ± 0,11 a	10,31 ± 0,11 a,b	10,20 ± 0,13 a	10,26 ± 0,13 a,b	< 0,001 ⁽¹⁾
C16:1n9	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,076 ⁽¹⁾
C16:1n7	0,54 ± 0,03 b	0,50 ± 0,03 a	0,48 ± 0,02 a	0,48 ± 0,02 a	0,48 ± 0,01 a	0,50 ± 0,02 a	< 0,001 ⁽¹⁾
C16:1	0,67 ± 0,04 b	0,63 ± 0,04 a,b	0,62 ± 0,03 a	0,62 ± 0,03 a	0,61 ± 0,01 a	0,64 ± 0,03 a,b	< 0,001 ⁽¹⁾
C17:0	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,711 ⁽¹⁾
C17:1	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,522 ⁽¹⁾
C18:0	2,79 ± 0,05	2,73 ± 0,05	2,80 ± 0,10	2,79 ± 0,12	2,81 ± 0,15	2,84 ± 0,13	0,057 ⁽²⁾
C18:1n9	74,47 ± 0,24 a	74,76 ± 0,47 a,b	74,96 ± 0,22 b	74,78 ± 0,28 a,b	74,97 ± 0,29 b	75,09 ± 0,60 a,b	0,001 ⁽²⁾
C18:2cc	9,70 ± 0,16	9,59 ± 0,12	9,46 ± 0,39	9,51 ± 0,16	9,45 ± 0,26	9,15 ± 0,66	0,021 ⁽²⁾
C20:0	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,115 ⁽²⁾
C20:1n9	0,95 ± 0,09 a	1,02 ± 0,07 a,b	1,12 ± 0,04 c	1,09 ± 0,05 b,c	1,09 ± 0,06 b,c	1,14 ± 0,03 c	< 0,001 ⁽¹⁾
C22:0	0,06 ± 0,05 a	0,15 ± 0,03 b	0,14 ± 0,02 b	0,13 ± 0,05 a,b	0,16 ± 0,03 b	0,14 ± 0,02 b	< 0,001 ⁽²⁾
SFA	14,10 ± 0,16 b	13,80 ± 0,20 a	13,65 ± 0,19 a	13,78 ± 0,12 a	13,72 ± 0,14 a	13,77 ± 0,17 a	< 0,001 ⁽¹⁾
MUFA	76,15 ± 0,25 a	76,46 ± 0,37 a,b	76,89 ± 0,24 b	76,66 ± 0,23 a,b	76,79 ± 0,44 a,b	77,14 ± 0,63 b	< 0,001 ⁽²⁾
PUFA	9,74 ± 0,12	9,59 ± 0,12	9,46 ± 0,39	9,54 ± 0,13	9,42 ± 0,27	9,06 ± 0,69	0,021 ⁽²⁾

^{a-c} Os valores médios apresentados em cada linha, com letras diferentes diferem significativamente, $p < 0,05$

⁽¹⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os ácidos gordos, a partir de uma análise ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Tukey, pois variâncias iguais poderiam ser assumidas ($p > 0,05$ pelo teste de Levene).

⁽²⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os ácidos gordos, a partir de uma análise one-way Welch ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Dunnett T3, pois variâncias iguais não poderiam ser assumidas ($p < 0,05$ pelo teste de Levene).

4.3. COMPOSIÇÃO EM TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

Os tocoferóis/tocotrienóis comumente descritos no azeite foram detetados e quantificados: α , β e γ - tocoferol. Simultaneamente com os fenóis totais, os tocoferóis/tocotrienóis, em especial o α -tocoferol, são um dos responsáveis pela atividade antioxidante dos azeites. O quadro 7 expõe em detalhe a caracterização dos tocoferóis e o teor em vitamina E das amostras avaliadas.

Quadro 7 – Valores médios de tocoferóis, tocotrienóis e vitamina E total (mg/Kg) do azeite com e sem adição de aromatizantes (média \pm desvio padrão).

	α -Tocoferol	α -Tocotrienol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	Vitamina E total
Controlo	181,72 \pm 3,52	0,00 \pm 0,00 a	0,74 \pm 0,05 a	3,84 \pm 0,16 a	186,30 \pm 3,69
Alho	178,71 \pm 2,94	0,42 \pm 1,38 a,b	0,83 \pm 0,05 b	4,13 \pm 0,11 b	184,08 \pm 2,78
Louro	179,20 \pm 15,70	0,00 \pm 0,00 a	0,78 \pm 0,08 a,b	4,30 \pm 0,60 a,b	184,27 \pm 16,28
Malagueta	192,58 \pm 16,23	0,79 \pm 0,14 b	0,84 \pm 0,08 b	4,39 \pm 0,53 a,b	198,60 \pm 16,75
Orégãos	184,35 \pm 15,09	0,71 \pm 0,34 b	0,80 \pm 0,06 a,b	4,29 \pm 0,65 a,b	190,15 \pm 15,95
Pimenta	180,00 \pm 14,11	0,00 \pm 0,00 a	0,82 \pm 0,09 a,b	4,37 \pm 0,61 a,b	183,19 \pm 14,62
<i>p-value</i>	0,067 ⁽²⁾	< 0,001 ⁽²⁾	0,004 ⁽¹⁾	< 0,001 ⁽²⁾	0,091 ⁽²⁾

^{a-b} Os valores médios apresentados em cada coluna, com letras diferentes diferem significativamente, $p < 0,05$

⁽¹⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os tocoferóis e tocotrienóis, a partir de uma análise ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Tukey, pois variâncias iguais poderiam ser assumidas ($p > 0,05$ pelo teste de Levene).

⁽²⁾ Os *p-value* são considerados para o efeito da adição de aromatizantes ao azeite sobre os tocoferóis e tocotrienóis, a partir de uma análise one-way Welch ANOVA. Se os efeitos dos aromatizantes foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Dunnett T3, pois variâncias iguais não poderiam ser assumidas ($p < 0,05$ pelo teste de Levene).

O α -tocoferol que representa mais de 97% do total de vitamina E esteve compreendido entre 178,71mg/Kg, no caso dos azeites aromatizados com alho, e os 192,58mg.Kg⁻¹, nos azeites aromatizados com malagueta. Para este vitâmero a adição de especiarias não provocou alterações significativas no azeite ($p > 0,05$). Em todos os estereoisômeros e no total de vitamina E presentes nos azeites, a malagueta foi o aromatizante onde estes obtiveram maior valor. A adição de aromatizantes ao azeite provocou alterações significativas dos valores de β -tocoferol e γ -tocoferol, uma vez que em todos eles ocorreu um incremento destes dois vitâmeros. O total de vitamina E, tal

como acontece para o α -tocoferol, não existem diferenças significativas na adição de aromatizantes ao azeite ($p = 0,091$).

Estes resultados têm correlações muito significativas ($p = 0,004$; $R^2 = 0,2131$) com os obtidos na avaliação da estabilidade oxidativa, que é discutida mais à frente.

4.4. TEOR EM FENÓIS TOTAIS

Os fenóis totais dos azeites estão representados na figura 7. A concentração de fenóis mais elevada foi detetado no azeite não aromatizado ($345,69 \pm 15,21$ mg equivalentes de ácido cafeico/kg de azeite), seguido, em ordem decrescente, pelos azeites aromatizados com louro, pimenta, malagueta, alho e orégãos ($293,84 \pm 23,61$ mg CAE/ kg).

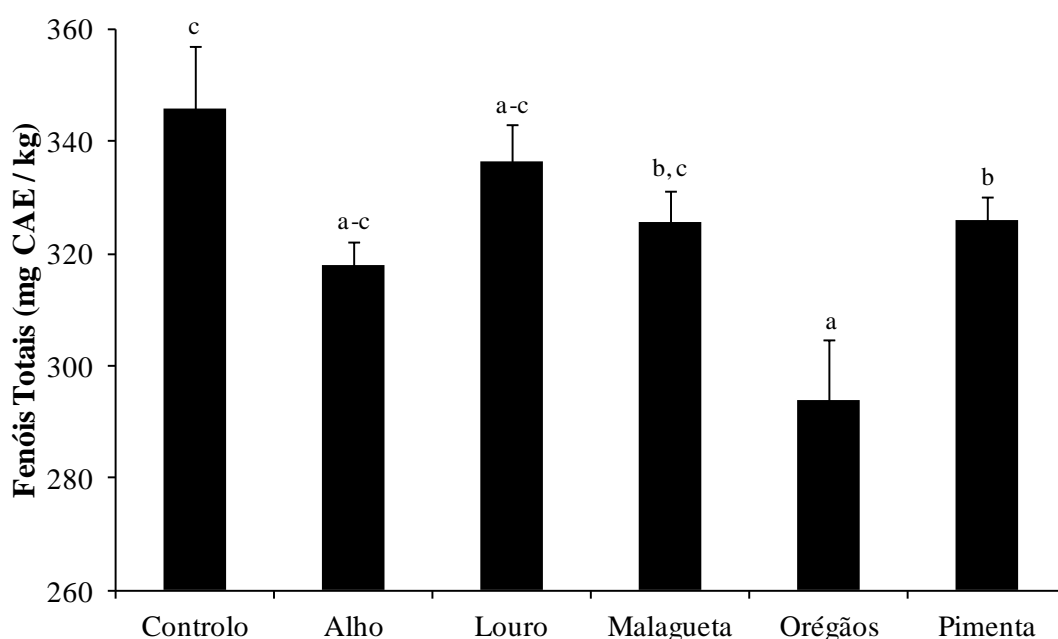


Figura 7 – Valores médios de fenóis totais do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-c} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).

A adição de aromatizantes induziu perdas ao nível dos fenóis totais de forma significativa ($p < 0,001$). Estas diferenças entre os fenóis totais de azeites não aromatizados e aromatizados podem ser explicados por interações ocorridas entre o azeite e os agentes aromatizantes, nomeadamente entre fenóis e outros compostos das especiarias (Negishi et al., 2002). A diferença encontrada entre os azeites aromatizados

e não aromatizados está de acordo com os obtidos por Baiano et al. (2009), apesar destes azeites terem sido aromatizados de forma diferente. Damiechki et al. (2001) realizaram um estudo destinado a examinar a presença de antioxidantes e pró-oxidantes em azeites aromatizados com orégãos e alecrim. Eles descobriram que o conteúdo fenólico total polar nos óleos aromatizados aumenta em comparação com a do controlo. Os fenóis totais representam uma das medidas da atividade antioxidantes dos azeites. Assim sendo e recorrendo à regressão podemos verificar que não existem correlações significativas entre este método e os restantes de medição da atividade antioxidante.

4.5. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

4.5.1. Atividade Sequestradora do radical DPPH (DPPH[•])

Um dos métodos para determinação da capacidade oxidante é medida pelo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]). Este método é uma das ferramentas essenciais para perceber o potencial antioxidante, mais especificamente, a atividade antiradicalar dos azeites. A atividade sequestradora do radical de DPPH foi expressa em μmol do radical DPPH por mL de azeite (figura 8).

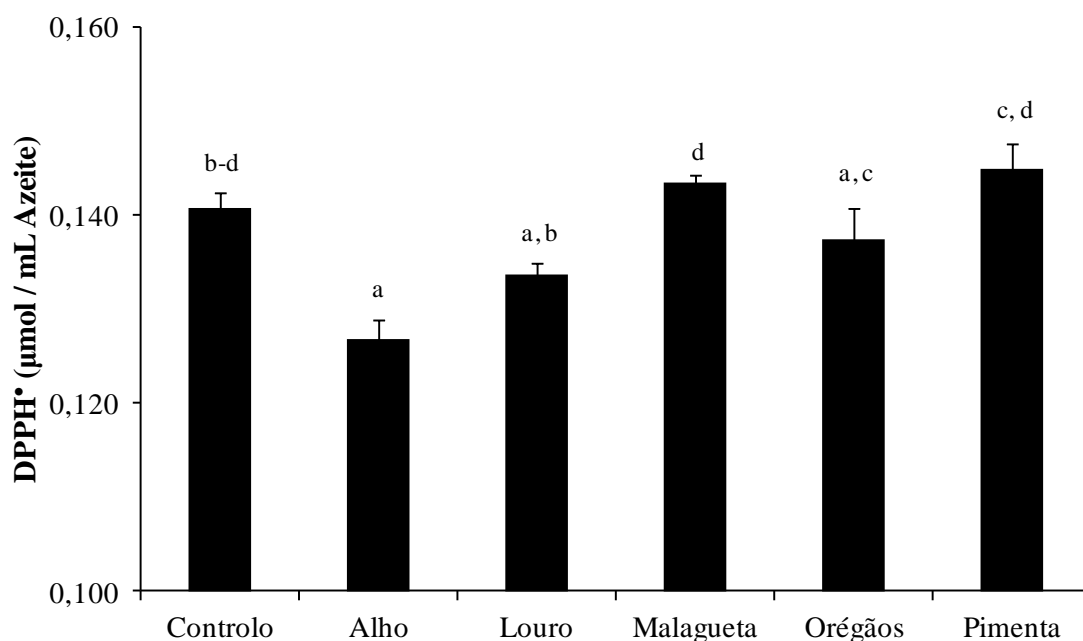


Figura 8 – Valores médios da atividade sequestradora do radical DPPH do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-d} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).

4.5.2. Atividade Sequestradora do radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$)

O método baseia-se na capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) em comparação com um padrão de referência antioxidante (Trolox). Assim, a atividade sequestradora do radical ABTS foi expressa em μmol de Trolox por mL de azeite (figura 9).

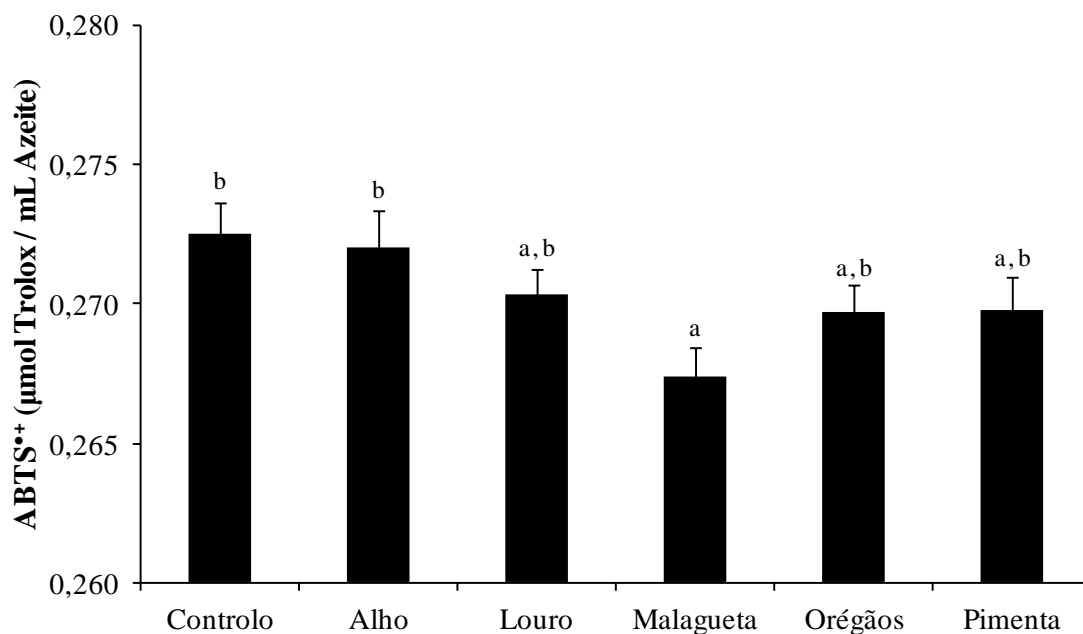


Figura 9 – Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-b} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).

Os valores médios de atividade sequestradora do radical ABTS variam entre $0,267 \pm 0,004$ para o caso do azeite com malagueta e $0,272 \pm 0,004$ para o azeite controlo. Verificamos que a adição de malagueta ao azeite diminui de forma significativa a atividade antioxidante. A figura 9 deixa transparecer que a adição de aromatizantes ao azeite baixa a atividade antioxidante, mas este método não mostrou ter qualquer correlação com os seus homólogos, que medem igualmente a atividade antioxidante, não permitindo fazer qualquer tipo de comparação entre eles.

4.6. ESTABILIDADE OXIDATIVA

A estabilidade oxidativa dos azeites com e sem aromatizantes está representada na figura 10.

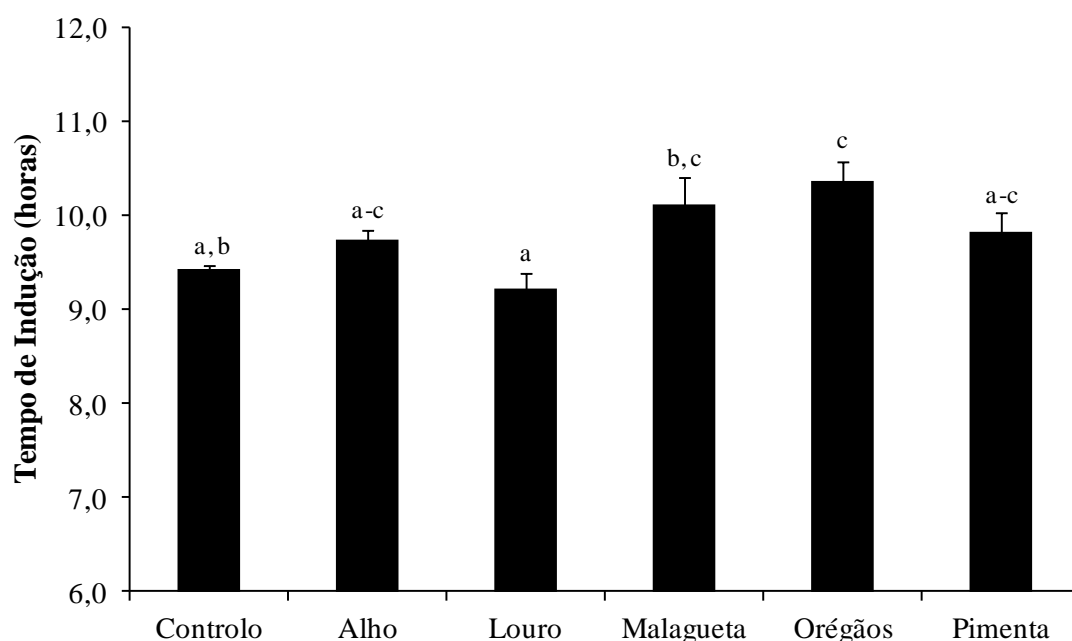


Figura 10 – Valores médios de estabilidade oxidativa (horas) do azeite com e sem aromatizantes. ^{a-c} Letras diferentes indicam significâncias diferentes ($p < 0,05$).

De uma forma geral, a adição de aromatizantes beneficiou a estabilidade oxidativa dos azeites, uma vez que apenas o azeite aromatizado com louro resistiu menos ao processo oxidativo induzido, que o azeite controlo. Este parâmetro tem a particularidade de refletir o que aconteceu em todos os outros parâmetros estudados. O azeite aromatizado com alho e orégãos infligiu maior qualidade nos parâmetros do índice de peróxido e do K_{232} . Os baixos valores destes parâmetros são indicativos da resistência à oxidação. O incremento de MUFA veio aumentar a resistência à oxidação, pois estes compostos são considerados estáveis. Existem significativas diferenças ($p = 0,001$) entre o azeite aromatizado com orégãos ($10,37 \pm 0,50$) e os azeites controlo e aromatizado com louro ($9,42 \pm 0,14$ e $9,23 \pm 0,39$, respetivamente). Damiechki et al. (2001) realizaram um estudo destinado a examinar a presença de antioxidantes e pró-oxidantes em azeites aromatizados com orégãos e alecrim. Os seus dados confirmam que a estabilidade oxidativa de azeite aromatizado foi maior do que a do controlo

utilizando o teste Rancimat. No caso particular deste trabalho a estabilidade oxidativa tem uma correlação significativa com o teor em vitamina E ($p = 0,004$; $R^2 = 0,2131$).

4.7. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada com o intuito de reduzir a dimensão original do espaço de variáveis dos azeites aromatizados, para então obter variáveis sintéticas que mantivessem a maior parte da informação das variáveis originais.

Para a Análise de Componentes Principais que apresentamos neste capítulo as variáveis utilizadas correspondem a alguns dos resultados de métodos físico-químicos aplicados na avaliação dos azeites, como sejam a acidez (Acidez), índice de peróxido (IP), K_{232} (K232), K_{270} (K270), ΔK (K), fenóis totais (FENOIS), atividade sequestradora de radicais livres (DPPH e ABTS), estabilidade oxidativa (ROS), α -tocoferol (toc), α -tocotrienol (toco), β -tocoferol (toc_A), γ -tocoferol (toc_B) e total de vitamina E (TotalVit.E). O objetivo nesta análise foi definir inter-relações entre variáveis para fornecer uma efetiva representação da variação dos dados.

Pela Análise de Componentes Principais obtivemos três componentes principais que explicam 63,2% da variância total das variáveis originais. O quadro 8 apresenta os coeficientes das componentes principais para cada variável.

Quadro 8 – Coeficientes das componentes principais

	Total (Vector Coordinates)			
	Dimension			Total
	1	2	3	
Acidez	,501	,003	,108	,612
IP	,016	,537	,220	,774
K232	,096	,459	,038	,593
K270	,031	,372	,227	,630
k	,480	,248	,006	,734
ROS	,428	,110	,093	,632
DPPH	,005	,635	,075	,714
FENOIS	,008	,390	,068	,466
ABTS	,148	,053	,166	,367
toc	,680	,011	,105	,795
toco	,327	,004	,298	,629
toc_A	,028	,072	,333	,433
toc_B	,643	,019	,022	,684
TotalVit.E	,719	,005	,067	,791
Active Total	4,109	2,919	1,825	8,853
% of Variance	29,351	20,849	13,039	63,239

Conforme os resultados mostrados no quadro 8, a primeira componente principal, denominada Dimensão 1, tem maiores pesos, respetivamente, nas variáveis TotalVit.E, toc, toc_B e Acidez. A segunda componente (Dimensão 2) tem pesos mais altos nas variáveis DPPH[•] e IP e finalmente a última componente não tem coeficientes (pesos) altos para nenhuma variável.

A figura 11 apresenta o gráfico de dispersão da primeira componente principal *versus* a segunda e terceira componentes, com representação dos seis azeites estudados. Este gráfico mostra claramente como as componentes principais são relações lineares que mostram como a avaliação dos azeites aromatizados se distribui.

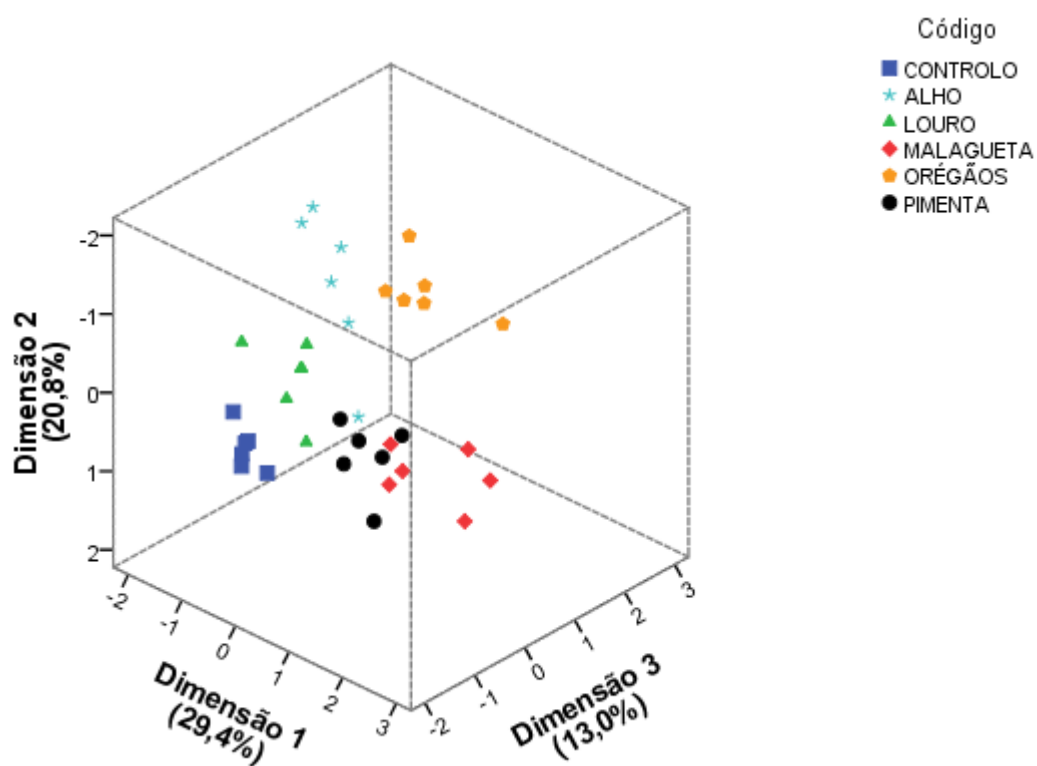


Figura 11 – Gráfico das componentes principais Dimensão 1, Dimensão 2 e Dimensão 3 com representação dos seis azeites estudados.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

O azeite é um produto largamente produzido e consumido ao longo dos tempos na cozinha mediterrânea, sendo bastante apreciado pelas suas características organolépticas, bem como pelas suas propriedades nutricionais. A oxidação lipídica do azeite faz diminuir as suas qualidades nutricionais e organolépticas. Assim, o azeite aromatizado com especiarias surge como forma de contrariar essas perdas, e por vezes, aumentar o tempo de prateleira.

Os resultados obtidos permitem concluir:

- ao nível dos parâmetros de qualidade que a adição de especiarias parece ter melhorado ou mantido as propriedades do azeite, exceto a acidez no caso do azeite aromatizado com alho, e a adição de malagueta e pimenta no caso da avaliação do K_{270} .
- A aromatização do azeite fez aumentar a relação (MUFA + PUFA)/SFA em comparação com o azeite não aromatizado.
- A vitamina E não sofreu perdas significativas com a adição de especiarias.
- O comportamento da atividade antioxidante não é claro, os fenóis sofrem perdas significativas com a aromatização dos azeites, assim como o DPPH[•] no caso dos azeites com aroma a alho e o ABTS^{•+} no caso da malagueta.
- A estabilidade oxidativa melhora com a adição de aromatizantes.

Globalmente, os resultados obtidos permitem afirmar que a adição de agentes aromatizantes não alterou significativamente os parâmetros de qualidade dos azeites, podendo favorecer um aumento da sua resistência e conseqüentemente um aumento do tempo de prateleira do produto. Contudo, para melhor clarificar e determinar se a adição de especiarias ao azeite consegue retardar o processo oxidativo, prolongando desta forma o tempo de prateleira do azeite, recomenda-se que em estudos futuros se aumente o tempo de aromatização do azeite. Os dados obtidos neste trabalho contribuíram para o enriquecimento da literatura científica na área, abrindo portas a melhorias e novos trabalhos relacionados com o tema.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

- Alter, M., & Gutfinger, T. (1982). Phospholipids in Several Vegetable Oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 59, 14-18.
- Angerosa, F., Campestre, C., & Giansante, L. (2006). Analysis and Authentication. *Olive Oil Chemistry and Technology* (Second Edi., pp. 113-172). AOCS Publishing.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Antoun, N., & Tsimidou, M. (1997). Gourmet olive oils: stability and consumer acceptability studies. *Food Research Internacional*, 30, 131-136.
- Baiano, A., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2010). Aromatization of olive oil. *Transworld Research Network*, 661, 1-29.
- Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & Notte, E.L. (2009). Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 1083-1092.
- Barla, A., Topcu, G., Oksuz, S., Tumen, G., & Kingston, D.G.I. (2007). Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chemistry*, 104, 1478-1484.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (Eds.). (2009). *Food Chemistry* (4th edition). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bianco, A., Melchioni, C., Romeo, G., Scarpati, M.L., & Uccella, N. (1998). Microcomponents of olive oil - III . Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl) ethanol. *Food Chemistry*, 63, 461-464.
- Boskou, D. (1996). *Olive Oil: Chemistry and Technology* (Boskou, D., Vol. 41, pp. 101-120). Champaign: AOCS Press.

- Boskou, D. (2008). Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health* (pp. 11-44). CRC Press.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive Oil Composition. *Olive Oil Chemistry and Technology* (Second Edi., pp. 41-76). AOCS Publishing.
- Boukhchina, S., Sebai, K., Cherif, A., Kallel, H., & Mayer, P.M. (2004). Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC-MS and LC-MS-MS. *Canadian Journal of Chemistry*, 1215, 1210-1215.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J.J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3535-40.
- COI. (2006). Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T.15/NC no.3/Rev.2. Madrid, Espanha.
- Capannesi, C., Palchetti, I., & Mascini, M. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, 71, 553-562.
- Damechki, M., Sotiropoulou, S., & Tsimidou, M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y Aceites*, 52, 207-213.
- Fang, F., Sang, S., Chen, K.Y., Gossiau, A., Ho, C.-T., & Rosen, R.T. (2005). Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *Food Chemistry*, 93, 497-501.
- Figiel, A., Szumny, A., Gutiérrez-Ortíz, A., & Carbonell-Barrachina, Á.A. (2010). Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98, 240-247.
- Firestone, D. (2005). Olive Oil. In F.Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volumes 1-6* (6th Edition, pp. 303-331). John Wiley & Sons.

- Gambacorta, G., Faccia, M., Pati, S., Lamacchia, C., Baiano, A. & La Notte, E. (2007). Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage. *Journal of Food Lipids*, 14, 202-2015.
- Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T., & Baris, O. (2012). Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. vulgare and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*, 130, 248-253.
- Haciseferoğulları, H., Özcan, M., Demir, F., & Çalışır, S. (2005). Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Food Engineering*, 68, 463-469.
- Harwood, J., & Aparício, R. (1999). *Handbook of olive oil, analysis and properties* (1st edition, p. 638). Springer.
- 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 Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1090-2097.
- ISO 9936:2006, I.S. (2006). Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography. Switzerland: ISO 2006.
- Issaoui, M., Flamini, G., Hajajj, M.E., Cioni, P.L., & Hammami, M. (2011). Oxidative Evolution of Virgin and Flavored Olive Oils Under Thermo-oxidation Processes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1339-1350.
- Mariz, I.F.A., Pais, L.S., Barreiro, F.F., & Silva, J.A.C. (2005). Equilibrium Moisture Content and Heat of Desorption of Garlic. In *9th International Chemical Engineering Conference*. CHEMPOR/05. Coimbra
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T.C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation, Heart Disease. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.

- Moldão-Martins, M., Beirão-da-Costa, S., Neves, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., & Beirão-da-Costa, M.L. (2004). Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha × piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference*, *15*, 447-452.
- Negishi, O., Negishi, Y., & Ozawa, T. (2002). Effects of food materials on removal of *allium*-specific volatile sulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3856–3861.
- Pokorný, J., & Korczak, J. (2001). *Antioxidants in food: practical application*. (J. Pokorný, N. Yanishlieva, & M. Gordon, Eds.) (pp. 311-330). Czech Republic.
- Polovka, M., Brezová, V., Staško, A., Mazúr, M., Suhaj, M., & Šimko, P. (2006). EPR investigations of gamma-irradiated ground black pepper. *Radiation Physics and Chemistry*, *75*, 309-321.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., & Quiles, J.L. (2006). Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. *Olive oil and health* (pp. 45-61). CAB International.
- 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 & Medicine*, *26*, 1231-1237.
- Reddy, S.V., Srinivas, P.V., Praveen, B., Kishore, K.H., Raju, B.R., Murthy, U.S., & Rao, J.M. (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, *11*, 697-700.
- Regulamento (CE) n° 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003.
- Regulamento (CEE) n° 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991.
- Regulamento (UE) n° 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011.
- Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *78*, 881-888.

- Santinelli, F., Damiani, P., & Christie, W.W. (1992). The triacylglycerol structure of olive oil determined by silver ion high-performance liquid chromatography in combination with stereospecific analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 552-556.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.
- Stanner, S., Hughes, J., Kelly, C., & Buttriss, J. (2004). A review of the epidemiological evidence for the "antioxidant hypothesis." *Public Health Nutrition*, 7, 407-422.
- Sánchez, J.L., Carretero, A.S., & Gutiérrez, A.F. (2001). Composición del aceite de oliva. In I. Omega 3 & F. Puleva (Eds.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario* (pp. 195-224). Granada.
- Tiscornia, E., Forina, M., & Evangelisti, F. (1982). Chemical composition of olive oil and variations induced by refining. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 59, 519-556.
- Tuck, K.L., & Hayball, P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636-644.
- USDA (2012). Dr. Duke's, *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em (<http://www.ars-grin.gov/duke/>) a 10 Julho de 2012.
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., & Galli, C. (2006). Antioxidant Properties of Olive Oil Phenolics. *Olive oil and health* (pp. 109-116). CAB International.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R.J., & Bovy, A.G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72, 1358-70.

