

**Desenvolvimento de maionese com “farinha de azeitona de mesa”:
caracterização físico-química, atividade antioxidante e sensorial**

Catarina Isabel Sousa Oliveira

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

Orientado por:

Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues
Prof. Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa

**Bragança
2020**

Agradecimentos

É com enorme satisfação e orgulho que entrego esta dissertação de mestrado, que em tanto me trouxe ensinamentos.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Doutor Nuno Miguel de Sousa Rodrigues, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por me ter motivado a realizar o presente trabalho, bem como toda a sua ajuda, orientação e conhecimentos transmitidos.

À minha coorientadora, Professora Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por todo o apoio, ensinamentos, boa disposição e incentivo na realização do presente trabalho.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por estar presente e auxiliar no rumo do trabalho.

À Professora Doutora Susana Casal, da Faculdade de Farmácia do Porto, por me auxiliar na realização de algumas análises efetuadas na sua instituição.

Agradeço, também, a todos os que durante este tempo partilharam comigo o laboratório, amigos e colegas. Agradeço especialmente à D. Maria do Céu Fidalgo, ao Rogério Antunes e à Luana Fernandes por toda a ajuda, ensinamentos laboratoriais transmitidos e acima de tudo por toda a paciência, boa disposição e apoio.

O maior agradecimento é dirigido à minha família (mãe, pai, padrinho, irmão e avô), por estarem sempre presentes, pelo incentivo e por serem o meu pilar. Sem eles, nada disto era possível.

Agradeço também ao meu namorado, Diogo Morais, por toda a paciência, carinho, motivação, companheirismo e por nunca me deixar desistir.

A todos, um muito obrigada!

Índice

Resumo	viii
Abstract	x
Capítulo 1	1
1. Introdução	2
Capítulo 2	5
2. Azeitona de mesa e seus subprodutos	6
2.1 Azeitona de mesa	6
2.1.1 Classificação das Azeitonas de Mesa	7
2.1.2 Composição química e atividade biológica	12
2.1.3 Produtos à base de azeitona de mesa	13
2.2 Inovação de produtos alimentares	14
2.2.1 Definição de Inovação	14
2.3 Bases para a criação de novos produtos: incorporação de “farinha de azeitona” na preparação de maioneses	15
Capítulo 3	18
3. Material e Métodos	19
3.1 Amostras e desenho experimental	19
3.2 Preparação e caracterização das “Farinhas de Azeitona de Mesa”	19
3.2.1 Cor	19
3.2.2 Composição Nutricional	20
3.2.2.1 Humidade	20
3.2.2.2 Gordura Total	20
3.2.2.3 Proteína	21
3.2.2.4 Cinzas	22
3.2.2.5 Hidratos de Carbono	22
3.2.2.6 Valor Energético	23
3.2.3 Caracterização da fração lipídica	23
3.2.3.1 Perfil em ácidos gordos	23
3.2.3.2 Perfil em tocoferóis	24
3.2.4 Atividade antioxidante	24

3.2.4.1	Preparação dos extratos para a determinação da atividade antioxidante e do perfil fenólico	24
3.2.4.2	Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH	25
3.2.4.3	Atividade Sequestradora do Radical ABTS ^{•+}	26
3.2.4.4	Capacidade redutora total	27
3.2.4.5	Diferentes Grupos Fenólicos	27
3.2.4.6	Perfil fenólico por HPLC-DAD.....	27
3.3	Preparação e caracterização das maioneses com “farinha de azeitona de mesa”	28
3.3.1	Características físico-químicas	29
3.3.1.1	Cor	29
3.3.1.2	Textura.....	29
3.3.1.3	Viscosidade.....	30
3.3.1.4	Atividade da água (aw)	30
3.3.1.5	pH	30
3.3.1.6	Humidade	30
3.3.1.7	Gordura Total	30
3.3.1.8	Cinzas	31
3.3.2	Fração lipídica.....	31
3.3.2.1	Perfil em ácidos gordos	31
3.3.2.2	Perfil em Tocoferóis	31
3.3.3	Atividade antioxidante	31
3.3.3.1	Preparação da amostra para a determinação da atividade antioxidante e do perfil fenólico	31
3.3.3.2	Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH	31
3.3.3.3	Capacidade redutora total	32
3.3.3.4	Perfil fenólico por HPLC-DAD.....	32
3.3.4	Parâmetros de Qualidade	33
3.3.4.1	Índice de Peróxidos	33
3.3.4.2	Análise por Espectrofotometria no Ultravioleta	33
3.3.5	Análise sensorial	34
3.4	Análise estatística	34
Capítulo 4	35

4. Resultados e discussão.....	36
4.1 Caracterização físico-química e biológica das farinhas de azeitona	36
4.1.1 Cor	36
4.1.2 Composição nutricional	38
4.1.3 Caracterização da fração lipídica	40
4.1.3.1 Perfil de ácidos gordos	40
4.1.3.2 Perfil em tocoferóis	41
4.1.4 Atividade antioxidante	42
4.1.4.1 Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, Atividade Sequestradora do Radical ABTS ^{•+} e Capacidade Redutora Total	42
4.1.4.2 Diferentes grupos fenólicos	44
4.1.4.3 Perfil fenólico	45
4.2 Caracterização físico-química e biológica das maioneses com “farinha de azeitona”	47
4.2.1 Cor	47
4.2.2 Textura	49
4.2.3 Viscosidade	51
4.2.4. Atividade da água, pH e teores de humidade, gordura e cinzas	52
4.2.5 Caracterização da fração lipídica	53
4.2.5.1 Perfil de ácidos gordos	53
4.2.5.2 Perfil em tocoferóis	55
4.2.6 Atividade antioxidante e perfil fenólico das maioneses	56
4.2.7 Parâmetros de Qualidade	58
4.2.8 Análise Sensorial	59
Capítulo 5	61
5. Conclusão	62
Referências	64

Índice de Figuras

Figura 1: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa por fermentação natural (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010)	9
Figura 2: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa curadas (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010).	10
Figura 3: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa oxidadas (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010).	11
Figura 4: Tubo de Falcon demonstrativo da separação de fases.	32
Figura 5: Aspeto visual das “farinhas de azeitona verde, mista e preta”.	38
Figura 6: Percentagens de inibição obtidas para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e a atividade sequestradora do radical ABTS ^{•+} (em cada um dos ensaios aplicados, letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas (p<0,05))	43
Figura 7: Capacidade redutora total das “farinhas de azeitona” (verde, mista e preta) (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas (p<0,05))	43
Figura 8: Diferentes grupos fenólicos avaliados aos comprimentos de onda de 280, 320 e 360 nm em “farinhas de azeitona verde, mista e preta” (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas (p<0,05)).	44
Figura 9: Aspeto visual das maioneses controlo e com “farinhas de azeitona verde, mista e preta” (da esquerda para a direita).	49
Figura 10: Exemplos de curvas obtidas no texturómetro durante a avaliação da textura das maioneses controlo e com “farinhas de azeitona verde, mista e preta”	50
Figura 11: Valores da viscosidade (mPa.s) em função da velocidade de rotação (rpm) para as maioneses: (A) Controlo; (B) Com “Farinha de Azeitona Verde”; (C) Com “Farinha de Azeitona Mista”; e (D) Com “Farinha de Azeitona Preta”.	51
Figura 12: Capacidade redutora total das maioneses (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas (p<0,05))	56
Figura 13: Percentagens de inibição obtidas para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH para as maioneses (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas (p<0,05)).....	57
Figura 14: Resultados obtidos na análise sensorial efetuada às maioneses.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação e cor dos tipos de azeitona de mesa conforme o seu grau de maturação.....	7
Tabela 2: Trabalhos realizados em maionese com incorporação de diversos produtos/compostos.	17
Tabela 3: Valores médios e respetivo desvio padrão dos parâmetros L*, a*, b*, C* e h determinados nas diferentes “farinhas de azeitona”	37
Tabela 4: Composição nutricional das “farinhas de azeitona de mesa”	39
Tabela 5: Perfil em ácidos gordos (% relativa) determinado nas “farinhas de azeitona verde, mista e preta”.	40
Tabela 6: Tocoferóis determinados nas farinhas de azeitona de mesa (verde, mista e preta) (mg/kg gordura).....	41
Tabela 7: Perfil fenólico (mg/g matéria seca) das diferentes “farinhas de azeitona”....	45
Tabela 8: Valores médios e respetivo desvio padrão dos parâmetros L*, a*, b*, C* e h determinados nas maionese com diferentes “farinhas de azeitona”	47
Tabela 9: Valores obtidos para os parâmetros relacionados com a textura e avaliados nas diferentes maionese	50
Tabela 10: Valores de atividade da água, pH e teores de humidade, gordura e cinzas para as diferentes maionese	52
Tabela 11: Perfil de ácidos gordos das maionese controlo e maionese com adição de “farinha de azeitona verde, mista e preta”	54
Tabela 12: Teores em tocoferóis (mg/kg de gordura extraída) das maionese	55
Tabela 13: Compostos fenólicos identificados nas maionese (mg/kg de maionese)...	57
Tabela 14: Valores dos índices de peróxidos e coeficientes de extinção específicos determinados nas maionese	58

Resumo

A azeitona é um dos produtos obtidos da oliveira (*Olea europaea* L.), podendo ser direcionada para a produção de azeite ou para azeitona de mesa. Este setor tem apostado na inovação de novos produtos e de novas formas de apresentação para dar resposta ao mercado, não só numa perspetiva de satisfazer os gostos e necessidades do consumidor, mas também com o intuito de reduzir as perdas nas indústrias alimentares.

A “farinha de azeitona de mesa” é um novo tipo de produto que está a ganhar cada vez mais expressão. De forma a valorizar ainda mais a azeitona de mesa, o presente trabalho pretendeu incorporar a “farinha” deste fruto num outro produto, nomeadamente maionese. Para tal procedeu-se à liofilização de azeitonas da cv. Cobrançosa em diferentes estados de maturação (verde, mista e preta) de forma a obter-se três farinhas distintas, tendo-se posteriormente procedido à sua caracterização física e nutricional (cor e teores de humidade, gordura total, proteína, cinzas, hidratos de carbono e valor energético), da fração lipídica (perfil em ácidos gordos e tocoferóis) e da atividade antioxidante (efeito bloqueador dos radicais livres DPPH e ABTS^{•+}, capacidade redutora total, diferentes grupos fenólicos e perfil fenólico). Posteriormente confeccionou-se no laboratório uma maionese padrão, à qual se incorporaram as farinhas de azeitona anteriormente obtidas, tendo sido determinados diversos parâmetros, tais como a cor, textura, viscosidade, atividade da água, pH e teores de humidade, gordura total e cinzas. Além disso, procedeu-se à caracterização da fração lipídica (perfil em ácidos gordos e tocoferóis); determinou-se a atividade antioxidante (efeito bloqueador dos radicais livres DPPH, capacidade redutora total e perfil fenólico); avaliaram-se parâmetros de qualidade (índice de peróxidos e coeficientes de extinção no ultravioleta), e procedeu-se à avaliação sensorial.

Obtiveram-se “farinhas” com cores distintas e diferentes características. A “farinha de azeitona verde” apresentou o menor teor de gordura e valor energético, em relação às outras duas farinhas. Pelo contrário, mostrou um maior teor de proteína e de hidratos de carbono em relação à “farinha de azeitona preta”. A “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou as maiores percentagens de ácido oleico (C_{18:1}) e de MUFA, bem como de α -tocoferol, γ -tocoferol e total de tocoferóis. Mostrou ainda ter a maior atividade antioxidante, avaliada através do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e atividade sequestradora de radicais livres de ABTS^{•+}. A “farinha de azeitona preta” foi a que apresentou as maiores percentagens de ácido palmítico (C_{16:0}) e de SFA, bem como a maior capacidade redutora total. Nas três “farinhas” desenvolvidas detetaram-se nove

compostos fenólicos, tendo o hidroxitirosol sido o maioritário, seguido do tirosol e luteolina.

Em relação às maioneses, também se obtiveram produtos com cores distintas. As maioneses com “farinhas de azeitona” apresentaram também uma textura diferente à da maionese controlo, salvo algumas exceções, e menores teores de gordura. Contudo, mostraram ter um maior teor de cinzas, possivelmente devido ao maior teor em sal. As maioneses com “farinhas de azeitona” apresentaram uma gordura com maiores percentagens de SFA e MUFA, e menores percentagens em PUFA, em relação à maionese controlo. De entre os tocoferóis, o α -tocoferol foi o maioritário, tendo sido a maionese controlo a que apresentou os maiores valores. A maionese com “farinha de azeitona verde” foi a mais firme, e apresentou os maiores teores em hidroxitirosol, tirosol e luteolina. A maionese com “farinha de azeitona mista” foi a que mostrou o mais baixo índice de peróxidos, mas todas as maioneses apresentaram níveis de oxidação lipídica, avaliados pelos coeficientes de extinção no ultravioleta, idênticos. Em relação à análise sensorial, as maioneses controlo e com “farinha de azeitona mista” foram as mais pontuadas ao nível da apreciação global.

Deste modo, podemos concluir com este trabalho que maioneses com incorporação de “farinhas de azeitona de mesa da cv. Cobrançosa” podem ser um produto inovador, que permitirá valorizar ainda mais esta cultivar e ir de encontro a novos públicos e às novas tendências de busca por produtos diferenciados.

Palavras-chave: Farinha de azeitona, desenvolvimento novos produtos, caracterização, valorização.

Abstract

The olive is one of the products obtained from the olive tree (*Olea europaea* L.), and can be used for the production of olive oil or table olives. This sector has been investing in the innovation of new products and new forms of presentation to respond to the market, not only with a view to satisfying consumer tastes and needs, but also with the aim of reducing losses in the food industries.

“Table olive flour” is a new type of product that is gaining more and more expression. In order to give even more value to table olives, the present work intended to incorporate “flour” of this fruit in another product, namely mayonnaise. To this end, lyophilisation of olives from cv. Cobrançosa in different states of maturity (green, mixed and black) in order to obtain three different flours, having subsequently proceeded to its physical and nutritional characterization (color and moisture content, total fat, protein, ash, hydrates of carbon and energy value), lipid fraction (profile in fatty acids and tocopherols) and antioxidant activity (blocking effect of free radicals DPPH and ABTS •⁺, total reducing capacity, different phenolic groups and phenolic profile). Subsequently, a standard mayonnaise was made in the laboratory, to which the previously obtained olive flours were incorporated, having been determined several parameters, such as color, texture, viscosity, water activity, pH and moisture, total fat and ash contents. In addition, the characterization of the lipid fraction (profile in fatty acids and tocopherols) was carried out; antioxidant activity was determined (blocking effect of DPPH free radicals, total reducing capacity and phenolic profile); quality parameters (peroxide values and extinction coefficients in the ultraviolet) were evaluated, and sensory evaluation was carried out.

“Flours” with different colors and different characteristics were obtained. The “green olive flour” had the lowest fat content and energy value, in relation to the other two flours. On the contrary, it showed a higher protein and carbohydrate content compared to “black olive flour”. The “green olive flour” was the one with the highest percentages of oleic acid (C_{18:1}) and MUFA, as well as α-tocopherol, γ-tocopherol and total tocopherols. It also showed to have the highest antioxidant activity, assessed through the blocking effect of DPPH free radicals and the free radical scavenging activity of ABTS •⁺. The “black olive flour” was the one with the highest percentages of palmitic acid (C_{16:0}) and SFA, as well as the highest total reducing capacity. In the three "flours" developed, nine phenolic

compounds were detected, with hydroxytyrosol being the majority, followed by tyrosol and luteolin.

Regarding mayonnaise, products with different colors were also obtained. The mayonnaise with “olive flour” also presented a different texture to that of the control mayonnaise, with some exceptions, and lower levels of fat. However, they have been shown to have a higher ash content, possibly due to the higher salt content. The mayonnaise with “olive flour” showed a fat with higher percentages of SFA and MUFA, and lower percentages in PUFA, compared to the control mayonnaise. Among the tocopherols, α -tocopherol was the majority, with mayonnaise control having the highest values. The mayonnaise with “green olive flour” was the firmest, and had the highest levels of hydroxytyrosol, tyrosol and luteolin. The mayonnaise with “mixed olive flour” was the one that showed the lowest peroxide values, but all the mayonnaise showed levels of lipid oxidation, evaluated by the extinction coefficients in the ultra violet, which are identical. In relation to sensory analysis, control and mayonnaise with “mixed olive flour” were the most scored in terms of global appreciation.

In this way, we can conclude with this work that mayonnaise with the incorporation of “table olive flour from cv. Cobrançosa” can be an innovative product, which will make it possible to further enhance this cultivar and meet new audiences and new trends in the search for differentiated products.

Keywords: Olive flour, new product development, characterization, enhancement.



CAPÍTULO 1

Introdução



1. Introdução

Nos últimos anos, a alimentação humana tem sofrido alterações resultantes do aumento da oferta e da diversidade de produtos industrializados. A maioria dos alimentos processados atualmente comercializados são ricos em gordura (Reis, 2013) e hidratos de carbono, dos quais se destacam os açúcares, o que do ponto de vista nutricional não é o mais indicado. Contudo, o recurso a este tipo de alimentos não é de todo negativo para o consumidor, uma vez que, em algumas situações, tem acesso a alimentos que foram enriquecidos com nutrientes e que contribuem para aumentar o valor nutricional (Barroso, 2014), ou que foram modificados de modo a evitar a ocorrência de alergias ou intolerâncias.

No entanto, é visível uma preocupação crescente ao nível dos hábitos alimentares e um aumento da procura de alimentos mais saudáveis, naturais e nutritivos. Para se ir de encontro às necessidades e gostos do consumidor, as empresas da área alimentar têm que investir na inovação de produtos. A procura por alimentos mais benéficos para a saúde fez com que a inovação alimentar fosse estimulada (Avermaete *et al.*, 2003; Costa e Jongen, 2006), sendo notória a aposta das empresas na inovação de produtos alimentares para atenderem às necessidades dos consumidores, mantendo-se competitivas e diferenciando-se assim perante outras empresas (Menrad, 2004). Esta aposta deve-se ao facto da globalização dos mercados ter provocado várias mudanças, tanto a nível económico como social, político e cultural. A procura de novos produtos, processos e serviços é provocada por este tipo de ambiente competitivo que existe entre as empresas (Gracia e Albisu, 2001).

A capacidade que as indústrias alimentares têm em inovar vai influenciar positivamente os seus lucros. Para apoiar o gerenciamento da inovação nas empresas, foram introduzidas em 2007 diversas Normas Portuguesas associadas à gestão da investigação, desenvolvimento e inovação (IDI), tais como a NP 4456:2007, relativa à terminologia e definições das atividades de IDI, a NP 4457:2007, a qual define os requisitos do sistema de gestão da IDI, e a NP 4458:2007, relativa aos requisitos de um projeto de IDI. Contudo, ainda existem poucas empresas com as suas atividades de IDI certificadas.

Em Portugal, a dieta mediterrânica é muito importante e valorizada pela população portuguesa, sendo que dela fazem parte dois produtos importantes: o azeite e as azeitonas

de mesa. Estes produtos são obtidos da oliveira (*Olea europaea* L.) que pertence à família botânica *Oleaceae*.

Segundo Charoenprasert e Mitchell (2012) e Hutkins (2006), estes dois produtos alimentares estão associados à redução de algumas doenças crónicas, como a diabetes, e à redução de doenças cardiovasculares. A prevenção destas doenças deve-se ao teor de compostos fenólicos (Andrikopoulos, 2010; Bach-Faig *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2007), pois há diversos trabalhos que demonstram uma correlação positiva entre a saúde e a ingestão diária deste tipo de compostos (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2016; Fregapane e Salvador, 2013; Vitaglione *et al.*, 2015).

Em Portugal, a olivicultura tem uma grande importância a nível socioeconómico, cultural e paisagístico. Esta cultura encontra-se um pouco por todo o território português, no entanto a sua concentração verifica-se sobretudo em regiões do interior, onde as condições são mais favoráveis para o desenvolvimento desta cultura. Como principal região produtora destaca-se o Alentejo, seguido de Trás-os-Montes, Beiras e Alto Douro.

De acordo com o Sistema de Informação do Azeite e Azeitona de Mesa (SIAZ, s/d), 2017 foi o ano que atingiu um volume máximo histórico relativo à produção de azeitona em Portugal, aproximando-se das 20 mil toneladas (INE, 2019). Tal facto não se voltou a observar em 2018, devido às condições meteorológicas adversas que se fizeram sentir na produção de azeitona, provocando uma queda estimada de 12% no volume total de azeitona colhida no ano de 2018. O setor oleícola tem também sentido a necessidade de inovar os produtos obtidos do olival. Deste modo, no presente trabalho pretendeu-se desenvolver um novo produto, designadamente uma maionese com farinha de azeitona de mesa. A ideia do desenvolvimento deste produto foi tirar partido de um alimento benéfico para a saúde e que também é muito usado na alimentação portuguesa, como é o caso das azeitonas de mesa, e adicionar a sua “farinha” à maionese dita “tradicional”, de modo a melhorar as suas características físico-químicas, biológicas e sensoriais. Optou-se, então, por se recorrer a azeitonas verdes, mistas e pretas da cv. Cobrançosa, uma vez que esta é uma cultivar autóctone da região de Trás-os-Montes. Apesar da expansão desta cultivar, não somente na região transmontana, mas também pelo resto do país, dada a sua excelente qualidade, a informação existente sobre a sua caracterização é ainda escassa.

Com o presente trabalho pretenderam-se criar condições para se obter mais dados e informações através de análises realizadas às farinhas de azeitona e ao produto final (maionese), para se verificar qual o efeito da adição da farinha de azeitona a este produto. Além disso, pretendeu-se avaliar de que forma as propriedades físico-químicas,

biológicas (atividade antioxidante) e sensoriais da maionese são afetadas pela adição da farinha de azeitona. Pretendeu-se também avaliar a aceitabilidade e preferência dos produtos a desenvolver por parte dos consumidores, através de uma prova de análise sensorial onde foram parametrizados determinados critérios dos produtos.

Estruturalmente o trabalho está organizado em quatro partes. A primeira parte consiste no **capítulo 1** relativa à introdução geral do trabalho. De seguida, o **capítulo 2** aborda a azeitona de mesa e seus subprodutos. Neste capítulo é descrito: (i) em que consiste a azeitona de mesa abordando-se a sua classificação, a composição química e atividade biológica das azeitonas, e produtos existentes no mercado à base de azeitona de mesa; (ii) o que se entende por inovação de produtos alimentares; e, por fim, (iii) abordam-se as bases para a criação de novos produtos, designadamente a incorporação de “farinha de azeitona” em maioneses, com o objetivo de desenvolver um produto agradável para o consumidor e que consiga responder a novos públicos, novas necessidades e alargar a oferta existente no mercado; reduzir perdas industriais e enriquecer o produto com compostos bioativos.

De seguida temos o **capítulo 3** que descreve o material e métodos utilizados na parte experimental deste trabalho. Primeiramente temos a preparação e descrição da caracterização das farinhas de azeitona, as quais determinamos desde gordura total; proteína; cinzas; humidade; hidratos de carbono; valor energético; cor; perfil fenólico; perfil de ácidos gordos; fenóis totais; método da captura do radical livre ABTS⁺; efeito bloqueador dos radicais livres DPPH; diferentes grupos fenólicos. Posteriormente temos a descrição da preparação e caracterização das maioneses com farinhas de azeitona, a qual se determinou gordura total; cinzas; humidade; proteína; hidratos de carbono; valor energético; cor; pH; a_w ; viscosidade; textura; absorvância; perfil fenólico; perfil de ácidos gordos; fenóis totais; efeito bloqueador dos radicais livres DPPH; peróxidos e por último realizou-se uma avaliação sensorial ao produto final.

Posteriormente temos o **capítulo 4** onde está patente os resultados e respetivas discussões e por último o **capítulo 5** que consiste na conclusão obtida da leitura dos resultados das análises físico-químicas realizadas ao produto.

CAPÍTULO 2

Azeitona de mesa e seus subprodutos



2. Azeitona de mesa e seus subprodutos

2.1 Azeitona de mesa

Segundo o Codex Alimentarius (2010), entende-se por azeitona de mesa o produto obtido a partir de frutos sãos, das variedades cultivadas da oliveira (*Olea europaea* L.), que pertencem à família botânica *Oleaceae*. Estes frutos são escolhidos de acordo com as suas características físico-químicas, que os tornam adequados para o processamento de azeitona de mesa. Deste modo, para a produção de azeitonas de mesa são selecionados os frutos cujo volume, forma, relação polpa/caroço, características da polpa, gosto, firmeza e facilidade de desprendimento do caroço as tornam particularmente adequadas para o processamento (Rejano *et al.*, 2010; Cabezas, 2011)

As azeitonas de mesa devem-se encontrar calibradas, limpas, sãs, com um sabor normal, possuir uma maturação adequada e estar isentas de matérias estranhas e de odores (Cabezas, 2011). Após a seleção dos frutos, estes são tratados para que haja a remoção do amargor, sendo preservados por fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem adição de conservantes (COI, 2004; NP 3034:2012). Esta preservação dos frutos serve para assegurar a sua estabilidade e evitar a sua deterioração.

Morfologicamente a azeitona é constituída por três tecidos principais: a pele (epicarpo), a polpa (mesocarpo) e o caroço (endocarpo). As três partes apresentam dimensões distintas, sendo que o mesocarpo é o tecido de maior dimensão, representando cerca de 70 a 90% do peso total (Galanakis, 2011; Peres *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012). A cv. Cobrançosa é uma cultivar de dupla aptidão, o que significa que tanto é utilizada para a produção de azeite, como é utilizada para a produção de azeitona de mesa. Apresenta um rendimento médio em azeite, entre os 18 e os 22% (Leitão *et al.*, 1986; Inês, 2015). Esta cultivar está incluída na lista das que originam azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP), tais como o Azeite de Trás-os-Montes, Azeite da Beira Alta, Azeites do Norte Alentejano e Azeite do Alentejo Interior (DGADR, 2018).

As azeitonas da cv. Cobrançosa têm um sabor ligeiramente amargo e picante. Contudo, este sabor pode variar consoante o grau de maturação em que o fruto se encontra (Galanakis, 2011). Uma azeitona que esteja mais verde, terá um sabor mais amargo e picante, enquanto que uma azeitona mais madura irá ter um sabor mais doce e suave.




2.1.1 Classificação das Azeitonas de Mesa

As azeitonas de mesa são caracterizadas segundo o seu grau de maturação, a sua forma de apresentação, e processamento tecnológico (COI, 2004; NP 3034:2012). O estado de maturação da azeitona é o principal fator responsável pelas características físicas e químicas do fruto.

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004), consoante o grau de maturação em que é colhida a azeitona, podem ser distinguidos três tipos: verde, mista e preta.


A Tabela 1 indica a classificação dos diferentes estados de maturação das azeitonas: verdes, mistas e pretas, com as respetivas imagens de cada uma para ser possível visualizar as diferenças visuais relativas à cor.


Tabela 1: Classificação e cor dos tipos de azeitona de mesa conforme o seu grau de maturação.


Tipo	Classificação	Cor	Imagem
Verde	O fruto é colhido durante o período de amadurecimento, mas antes de ter atingido a coloração rosada típica da maturação.	Pode variar de verde a amarelo palha.	
Mista	O fruto é colhido durante a mudança de coloração, mas antes de atingir a sua maturação completa.	Pode variar entre tons rosados e acastanhados ou esverdeados.	
Preta	O fruto é colhido completamente maduro, ou pouco antes de atingir a sua maturação completa.	Pode variar entre negro avermelhado a castanho-escuro, passando por tons violáceos.	


Relativamente à classificação da azeitona de mesa consoante a sua forma de apresentação, estas podem ser classificadas como: inteiras, descaroçadas, recheadas e apresentadas como pasta de azeitona.

Segundo o COI (2004), a Norma Portuguesa nº 3034:2012 e o Codex Alimentarius (2010), entende-se por:

 **Inteira:** é aquela que apresenta uma forma dita normal, que ainda contém caroço e pode ser apresentada com ou sem pedúnculo. Esta azeitona pode ser apresentada de forma britada, que é quando a azeitona é submetida a um corte ou processo de quebra da polpa, mas que o caroço não sofre qualquer quebra, permanecendo inteiro e intacto; ou de forma retalhada, que é quando a polpa da azeitona é golpeada sem que haja quebra do caroço;

 **Descaroçada:** é aquela que apresenta uma conformidade normal, mas, que, no entanto, lhe foi retirado o caroço. Esta azeitona pode ser apresentada de cinco formas diferentes: dividida, que é submetida a uma divisão em duas partes aproximadamente iguais, e que podem ser recheadas ou não; em quartos, que é dividida em quatro partes aproximadamente iguais; em fatias, que é uma azeitona que é dividida em mais de quatro partes aproximadamente iguais; quebrada, que corresponde a uma azeitona que é acidentalmente quebrada enquanto é descaroçada. Estas azeitonas podem ser recheadas; e picada, é um processo de apresentação onde a azeitona é desprovida de ter uma forma definida ou de ser fragmentada em fatias;

 **Recheada:** é aquela que se apresenta descaroçada e recheada com diversos produtos, tais como: pimento (que é o mais utilizado), casca de limão, avelã, amêndoas, salsa, anchova, laranja, azeitona ou com pasta de azeitona.

 **Pasta de azeitona:** a pasta de azeitona é obtida a partir da polpa de azeitona triturada, podendo depois ser adicionados outros ingredientes.

A azeitona de mesa para além de ser classificada pelos dois parâmetros anteriormente descritos, é também classificada de acordo com o processo tecnológico que lhe deu origem.

O processamento tecnológico das azeitonas tem como objetivo remover o amargor do fruto, principalmente a oleuropeína (Arroyo-López *et al.*, 2008; Charoenprasert e Mitchell, 2012), tendo, também, como intuito adquirir características organoléticas desejáveis, tais como cor, sabor, aroma e textura.

Existem diversos métodos de processamento de azeitona de mesa, como por exemplo:

🌿 **Método de produção de azeitona de mesa por fermentação natural (método Grego):**

O método de produção de azeitona de mesa por fermentação natural encontra-se representado na Figura 1.

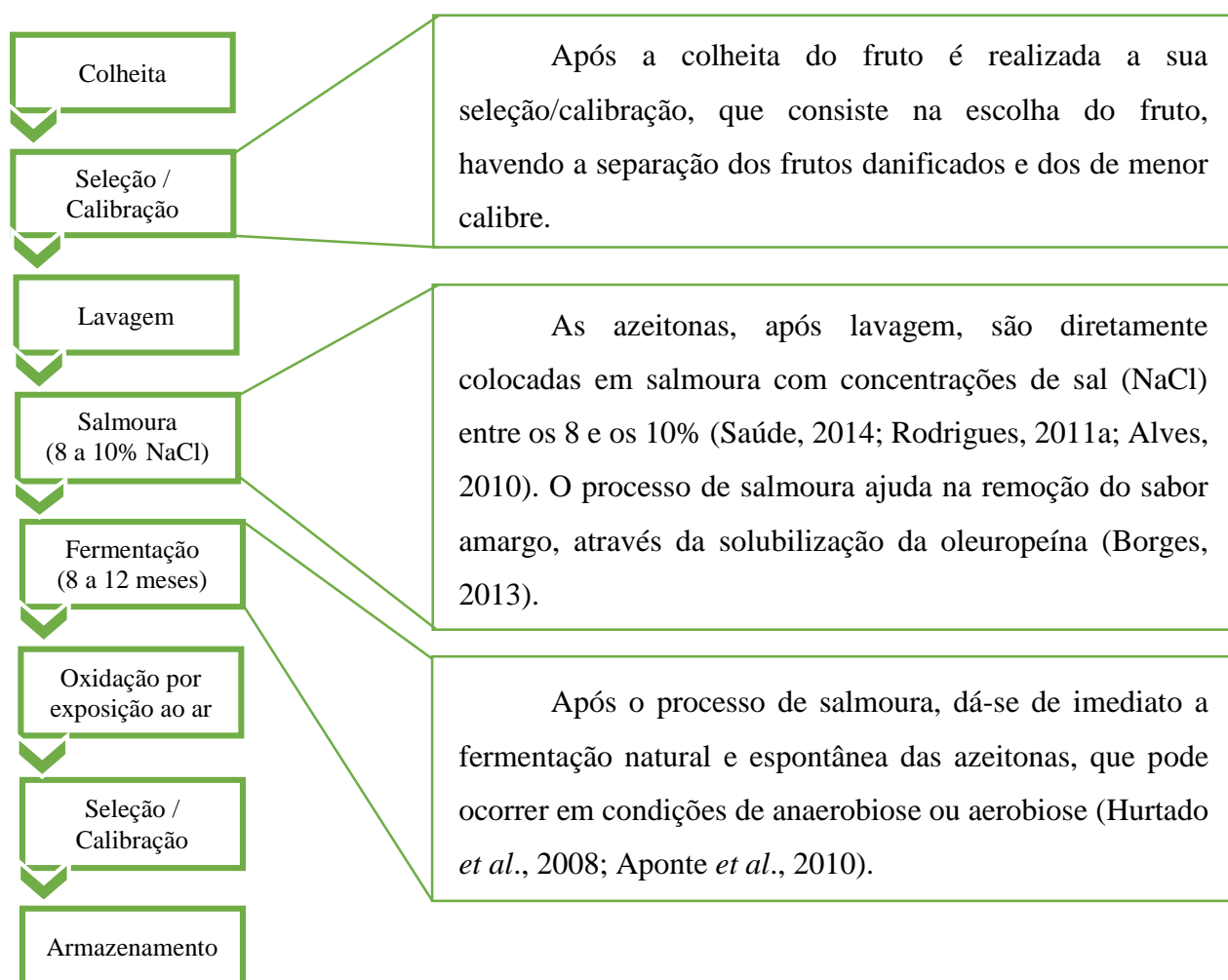


Figura 1: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa por fermentação natural (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010)

Método de produção de azeitona de mesa verdes (método Sevilhano):

A produção de azeitona de mesa pelo Estilo Sevilhano encontra-se representado na Figura 2.

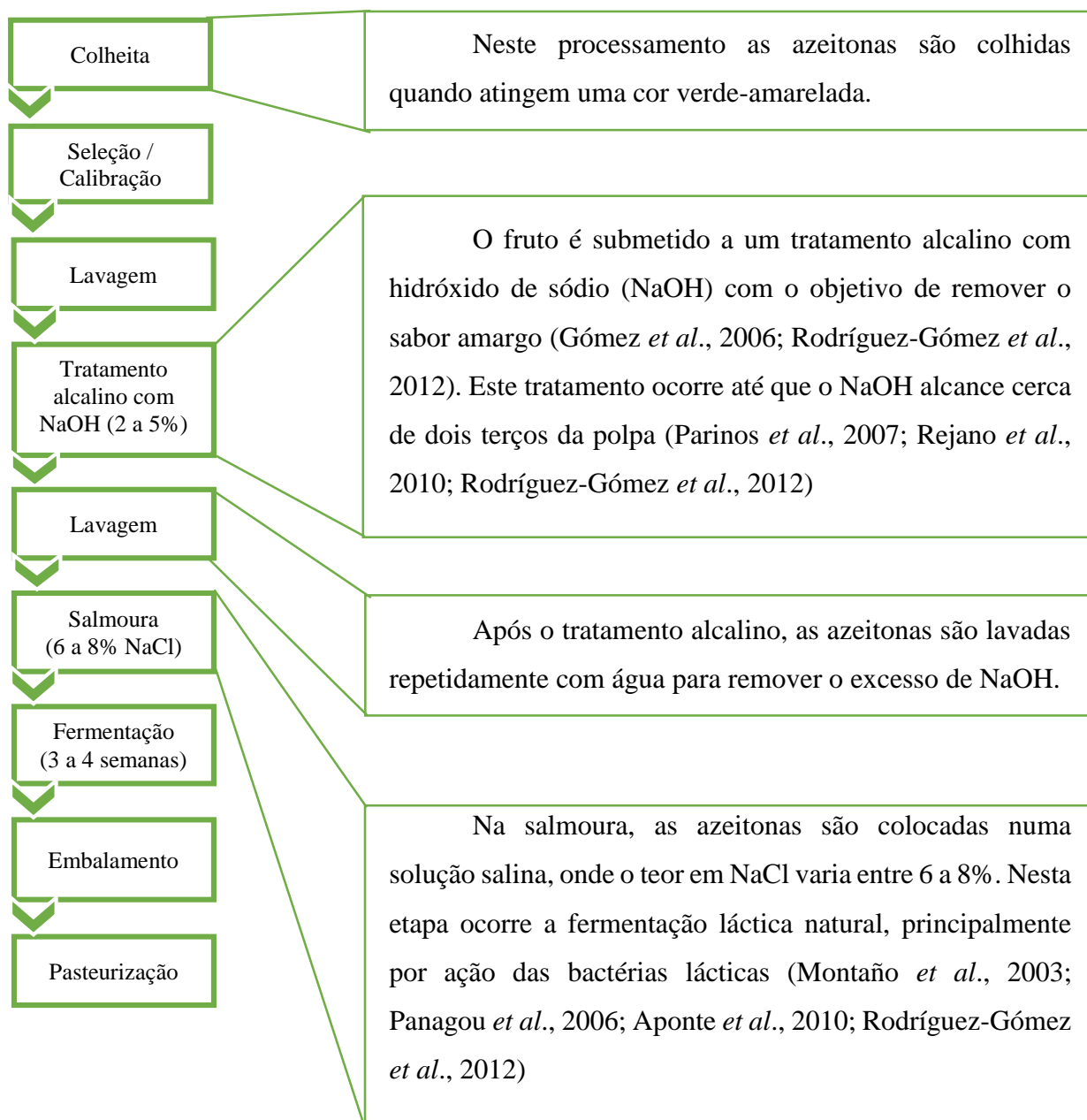


Figura 2: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa curadas (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010).

Método de produção de azeitona de mesa pretas oxidadas (método Californiano):

A produção de azeitona de mesa pretas oxidadas pelo Método Californiano encontra-se representada na Figura 3.

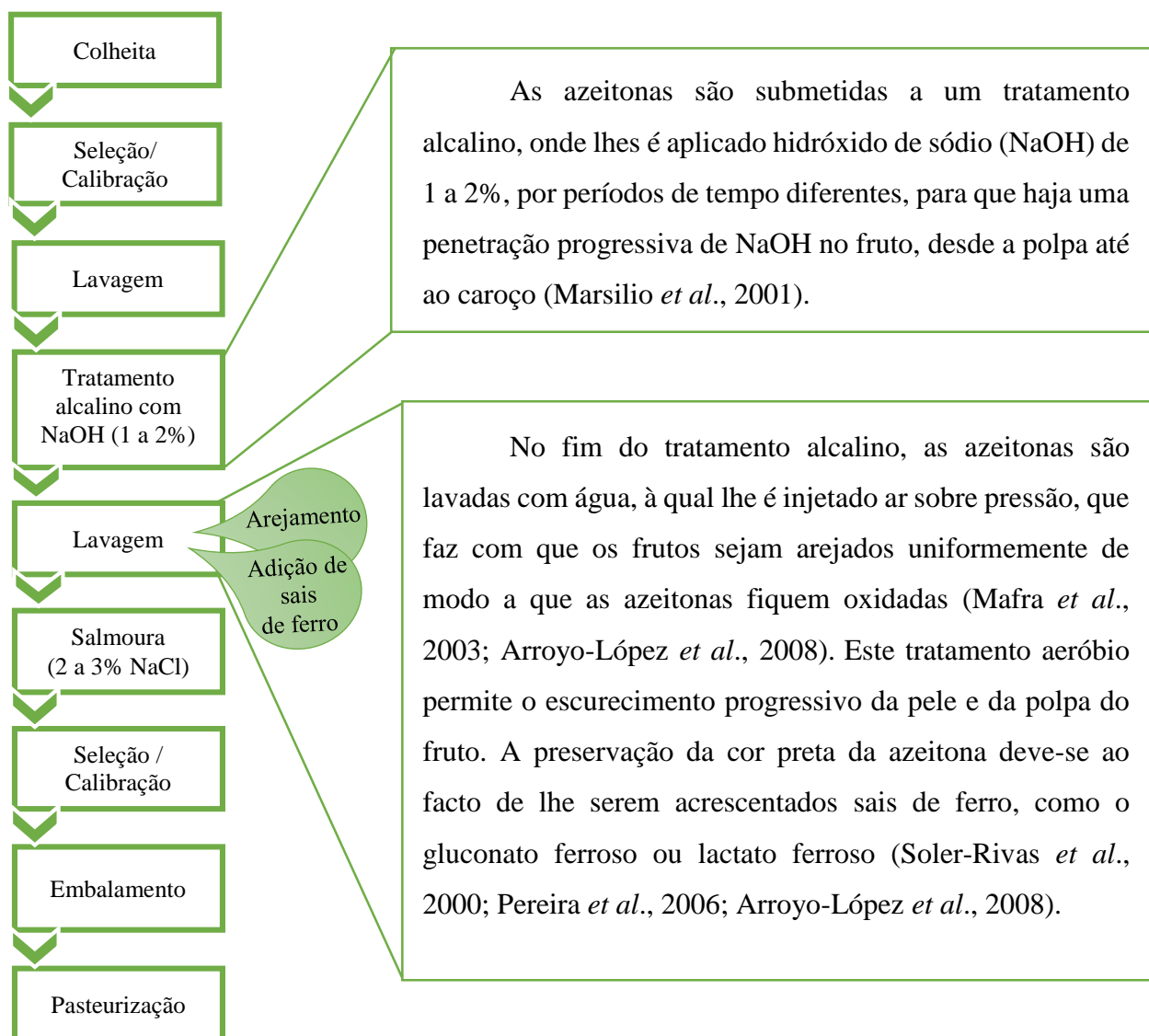


Figura 3: Diagrama do processo de produção de azeitona de mesa oxidadas (Saúde, 2014; Rodrigues, 2011a; Alves, 2010).

Os três métodos referidos anteriormente (fermentação natural, estilo Sevilhano e estilo Californiano) são os mais utilizados na produção de azeitona de mesa (Malheiro *et al.*, 2012; Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012).

No entanto, segundo o Codex Alimentarius (2010), os processos tecnológicos não se restringem apenas a estes três métodos. De facto, podem existir outros métodos de

preparação de azeitona de mesa, tais como as especialidades. Estas são azeitonas de mesa preparadas segundo métodos diferentes aos descritos anteriormente, como o caso das azeitonas preparadas tradicionalmente, as ditas “alcaparras”, que são típicas da região de Trás-os-Montes, as azeitonas desidratadas com sal ou as azeitonas feitas no forno.

2.1.2 Composição química e atividade biológica

A qualidade do produto final, a azeitona de mesa, é determinada pela composição química e pelas propriedades físicas da azeitona. São diversos os fatores (condições climáticas, variedade que é utilizada, estado de maturação do fruto no momento da colheita) que influenciam a qualidade da azeitona e a sua composição química (Conde *et al.*, 2008). No entanto, tanto o tratamento alcalino como a fermentação provocam alterações físico-químicas na azeitona de mesa, afetando os constituintes lipídicos, fenóis, açúcares e sais que estão presentes no fruto (Sousa *et al.*, 2011).

Relativamente à composição da azeitona de mesa, sabe-se que a sua polpa é constituída maioritariamente por água, rondando os 70 a 75%. Alguns autores (Almeida, 2013; Conde *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 1997) referem que a azeitona de mesa tem uma fração lipídica compreendida entre os 14 e os 15% e que possuem cerca de 2 a 5% de açúcares, designadamente glucose (1 a 3% do peso da polpa) e frutose (0,1 a 1,1%).

Estes são alguns exemplos dos principais constituintes da azeitona de mesa, sendo que existem outros, como os ácidos gordos e compostos fenólicos (2,0 a 2,5% da polpa da azeitona) (Rodríguez *et al.*, 2009; Nogueira, 2012), que também contribuem para a qualidade do produto final.

As azeitonas de mesa apresentam na sua composição compostos fenólicos e tocoferóis, que são compostos biológicos de grande importância. Estes dois micronutrientes são importantes porque conferem propriedades antioxidantes à azeitona de mesa (Malheiro, 2010).

Considera-se que os compostos fenólicos são uma classe muito importante no fruto. O perfil fenólico pode variar muito, tanto a nível da qualidade como da quantidade existente no fruto. Segundo Charoenprasert e Mitchell (2012), os compostos fenólicos estão localizados em redor do caroço (endocarpo), mas sobretudo na pele (epicarpo) das azeitonas.

Num fruto, como a azeitona, onde exista um elevado teor de compostos fenólicos (tirosois, hidroxitirosois e ácido oleanólico) há evidências de que estas apresentam

importantes propriedades biológicas (Ryan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006; Savarese *et al.*, 2007), tais como: propriedades antimicrobianas (Sousa *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007) e propriedades antioxidantes (Owen *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006; Ben Othman *et al.*, 2009; Malheiro *et al.*, 2011).

As propriedades antioxidantes das azeitonas de mesa assumem um papel protetor no corpo humano, pois elas reduzem os danos oxidativos. Para MacDonald-Wicks *et al.* (2006), elas têm capacidade de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, como é o caso de moléculas associadas a processos biológicos.

O potencial antioxidante é influenciado pelo método de produção da azeitona de mesa. As azeitonas de mesa que foram processadas pelo método de fermentação natural apresentam maior teor em compostos fenólicos e uma atividade antioxidante maior (Pereira *et al.*, 2006). Por sua vez, no método de produção de azeitona de mesa pretas oxidadas, estas apresentam um menor teor em compostos fenólicos. Assim, as azeitonas de mesa produzidas por este método vão ter um potencial antioxidante inferior, comparativamente às obtidas pelo método de fermentação natural.

De entre os compostos fenólicos, é importante destacar o hidroxitirosol (Medina *et al.*, 2007) e a oleuropeína (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2002) que têm apresentado propriedades antimicrobianas nas azeitonas de mesa.

2.1.3 Produtos à base de azeitona de mesa

O setor olivícola tem apostado na inovação de novos produtos e em novas formas de apresentação para dar resposta ao mercado. A valorização e o aproveitamento de subprodutos da azeitona têm sido cada vez mais equacionados pelas empresas deste setor com uma perspetiva, não só de desenvolver um produto/processo novo ou significativamente melhorado, mas também com vista à minimização dos resíduos e desperdícios produzidos durante a laboração.

Hoje em dia há diversos produtos alimentares que têm por base a utilização de azeitonas, como o caso de compotas, pastas, snacks, entre outros. As pastas de azeitona são produzidas com azeitona de mesa, e, por vezes, são encaradas pelas empresas como uma boa alternativa para valorizar azeitonas de mesa que seriam difíceis de escoar devido, por exemplo, ao seu baixo calibre ou apresentação de defeitos visuais.

Na região de Trás-os-Montes são produzidas azeitonas de mesa de qualidade e cuja produção tem uma vasta tradição, designadamente as alcaparras, que são azeitonas

de mesa que devem ser apelidadas de “azeitonas verdes descaroçadas em pedaços” produzidas de forma tradicional.

Contudo, em termos gerais, ainda se pode constatar que existe espaço para o desenvolvimento de novos produtos à base de azeitona.

2.2 Inovação de produtos alimentares

2.2.1 Definição de Inovação

Fornecer um conceito preciso e amplamente aceite sobre inovação não é, de todo, uma tarefa fácil. No entanto existem muitas definições que tentam sustentar o conceito de inovação.

A Norma Portuguesa 4456 de 2007 refere que *“Inovação corresponde à implementação de uma nova ou significativamente melhorada solução para a empresa, novo produto (bem ou serviço), processo, método organizacional ou de marketing, com o objetivo de reforçar a sua posição competitiva, aumentar o desempenho, ou o conhecimento”*.

A inovação tem como requisito mínimo, que qualquer produto, processo, método organizacional ou de marketing, sejam novos ou significativamente melhorados para a empresa (OCDE e FINEP, 2005). Em diversas situações, as empresas investem na proteção dos seus produtos ou serviços através de patentes, marcas e design, porque é importante impedir que as organizações adversárias copiem os seus produtos, ajuda a evitar “fraudes” económicas em atividades de investigação, desenvolvimento e comercialização, e a aumentar o valor comercial da empresa. Este investimento é realizado pelas empresas que pretendem apostar no desenvolvimento de novos produtos ou serviços para conquistarem uma maior participação no mercado e conseqüentemente alcançarem uma maior rentabilidade.

As empresas precisam de ser competitivas, e para tal, elas necessitam de estar constantemente a inovar, tendo assim a necessidade de adquirirem capacidade de inovação, ou seja, a empresa tem que disponibilizar recursos, estruturas colaborativas, e processos para resolução de problemas (Bayarçelik *et al.*, 2014).

As normas Portuguesas associadas à Inovação são as seguintes:

- Norma Portuguesa 4456:2007: estabelece a terminologia e as definições das atividades de IDI. Esta norma está associada à NP EN ISO 9000:2005 “Sistemas de Gestão da Qualidade - Fundamentos e vocabulário (ISO 9000:2015)”;

- Norma Portuguesa 4457:2007: define os requisitos de um sistema eficaz de gestão da IDI, permitindo que as empresas adotem uma política de IDI clara, que permita melhorar o desempenho inovador das organizações e alcancem os seus objetivos de inovação. Esta norma está alinhada com a NP EN ISO 9001:2000 “Sistemas de Gestão da Qualidade: Requisitos (ISO 9001:2000)” e com a NP EN ISO 14001:2004 “Sistemas de Gestão Ambiental: Requisitos e linhas de orientação para a sua utilização (ISO 14001:2004¹)” (Norma Portuguesa 4457: 2007), bem como com outras normas de sistemas de gestão, pela adoção do conceito de compatibilidade desenvolvido em conjunto pelos Comités Técnicos ISO/TC 176 “*Quality management and quality assurance*” e ISO/TC 207 “*Environmental management*”. A implementação desta norma pode ser independente, ou pode estar agregada com outras normas de sistemas de gestão. Além disso, segundo a NP 4457:2007, uma empresa que pretenda implementar um Sistema de Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI), deve seguir uma abordagem segundo o ciclo PDCA (Planear-Executar-Verificar-Atuar), tendo sempre em vista a melhoria contínua;

- Norma Portuguesa 4458:2007: define os requisitos de um projeto de IDI desde a definição dos seus objetivos, planeamento, acompanhamento, controlo e avaliação de resultados, sendo aplicável a qualquer projeto de IDI. Esta Norma é aplicável a projetos de IDI, não dependendo do seu grau de complexidade, duração ou área de negócio. Esta Norma segue a terminologia e as definições das atividades de IDI indicadas na NP 4456:2007.

2.3 Bases para a criação de novos produtos: incorporação de “farinha de azeitona” na preparação de maioneses

Atualmente há uma preocupação crescente a nível alimentar, principalmente com o bem-estar, havendo uma maior procura por alimentos com menores teores de gordura ou com propriedades benéficas para a saúde, o que força as indústrias alimentares a desenvolverem produtos que cumpram determinados requisitos mínimos relacionados com a saúde.

No presente trabalho perspetivou-se a criação de maioneses com incorporação de “farinhas de azeitona de mesa da cv. Cobrançosa”, de modo a introduzir propriedades benéficas deste fruto nas maioneses. As azeitonas serão selecionadas consoante o seu grau

¹ Atualmente esta norma foi substituída pela NP EN ISO 14001:2015.

de maturação (verde, mista e preta), para que depois se possa verificar qual o efeito nas propriedades físico-químicas e antioxidantes das maioneses obtidas face ao controlo (maionese sem adição de “farinha de azeitona”), bem como avaliar a preferência por parte do consumidor das maioneses elaboradas, a nível organolético. Em termos gerais, pretende-se desenvolver um produto agradável para o consumidor e que consiga responder a novos públicos, novas necessidades e alargar a oferta existente no mercado.

A maionese é uma emulsão composta de óleo, ovos, vinagre e sumo de limão, sendo considerada um alimento com alto teor lipídico. É produzida através da mistura da gema de ovo, vinagre e sumo de limão, com a ajuda de uma varinha mágica. Os condimentos são todos misturados e posteriormente é-lhe adicionado o óleo, lentamente e em fio corrente, formando-se a emulsão.

Alguns trabalhos foram já realizados em maioneses, nos quais se têm incorporado diversos produtos/compostos a essa matriz, tal como indicado na Tabela 2. Os produtos adicionados têm variado entre ervas aromáticas, gengibre, beterraba e polpa de banana verde, observando-se que a sua presença afeta as propriedades reológicas e a estabilidade oxidativa das maioneses obtidas. Do nosso conhecimento, até ao momento, não foi adicionada azeitona de mesa a maioneses, sendo um dos objectivos do presente trabalho avaliar as modificações observadas ao nível físico-químico, biológico e sensorial, nesses novos produtos a desenvolver, em relação ao controlo (maionese à qual não foram adicionadas “farinhas de azeitona”). Deste modo, no final, pretende-se obter um produto que o consumidor goste e que esteja disposto a adquiri-lo. Além disso, pretende-se que o novo produto venha dar resposta a necessidades de novos públicos, permitindo aumentar a oferta existente no mercado, reduzir perdas industriais através da valorização de frutos de menor calibre e/ou com pequenos defeitos visuais, e enriquecer o produto com compostos bioativos.

Tabela 2: Trabalhos realizados em maioneses com incorporação de diversos produtos/compostos.

Ingredientes utilizados na elaboração de maionese	Parâmetros avaliados	Observações	Referência
Ervas aromáticas (manjeriço, manjerona/tomilho e alecrim) e diferentes tipos de óleos (soja, coco, gergelim e azeite)	Análise sensorial	Maionese aromatizada com manjerona/tomilho foi a que obteve maior preferência. Pelo contrário, a maionese elaborada com óleo de gergelim foi a que obteve a menor aceitação.	Salgado <i>et al.</i> (2006)
Beterraba processada (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS por HPLC), estabilidade oxidativa, viscosidade, textura e análise sensorial	A beterraba processada pode proteger a maionese da oxidação lipídica durante o armazenamento a 4 °C por 28 dias.	Raikos <i>et al.</i> (2016)
Gengibre em pó	pH, estabilidade oxidativa, reologia e avaliação sensorial	Gengibre em pó reduziu o processo de oxidação e a formação dos produtos de oxidação secundária durante o armazenamento por 20 semanas. A estabilidade oxidativa da maionese preparada pode ser melhorada pela adição de gengibre em pó nas concentrações de 1,0% e 1,25%.	Kishk e Elsheshetawy (2013)
Polpa de banana verde e óleo de soja	Medições reológicas: índice de comportamento, coeficiente de consistência, tensão de inércia e viscosidade aparente; Análises à humidade, proteína, gordura total, fibra bruta, cinzas, pH, acidez e viscosidade.	Verificou-se que a polpa de banana contribuiu para um aumento nos valores de tensão de inércia e viscosidade aparente e que o óleo de soja causou um aumento na viscosidade aparente e no coeficiente de consistência de todas as amostras.	Izidoro <i>et al.</i> (2008)

CAPÍTULO 3

Material e Métodos



3. Material e métodos

3.1 Amostras e desenho experimental

Para a realização do presente trabalho foram adquiridos 5 kg de azeitona de mesa de cura natural da cv. Cobrançosa num produtor local da Região de Trás-os-Montes, mais precisamente localizado em Mirandela. Os 5 kg de azeitona eram compostos por azeitonas inteiras com diferentes graus de maturação (azeitonas verdes, azeitonas mistas, azeitonas pretas), aromatizadas com algumas especiarias. Em laboratório foi feita a escolha e separação das azeitonas de acordo com o seu grau de maturação. Após seleção das azeitonas, o trabalho ocorreu em duas etapas distintas. Na primeira etapa foram preparadas diferentes “farinhas de azeitona” (verde, mistas e pretas), seguida pela sua caracterização. Na segunda etapa foi feita a adição das diferentes “farinhas de azeitona” à maionese, onde após homogeneização foi também realizada a sua caracterização. Os procedimentos usados estão descritos nas alíneas seguintes:

3.2 Preparação e caracterização das “farinhas de azeitona de mesa”

Para proceder à preparação das “farinhas de azeitona de mesa”, após a separação das azeitonas segundo o seu grau de maturação, realizou-se o descaroçamento das mesmas. As azeitonas descaroçadas foram dispostas em oito caixas destinadas para cada tipo de azeitona (verde, mista e preta), devidamente identificadas. Cada caixa continha 100g de azeitona de mesa fresca. Após congelamento a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, as diferentes amostras foram liofilizadas.

Após a liofilização das azeitonas, estas foram trituradas e colocadas num tubo de ensaio, devidamente identificado, apenas com a quantidade necessária para a realização dos primeiros ensaios. O material excedente foi colocado em sacos de vácuo, para conservar. Para proceder à sua caracterização determinaram-se os parâmetros a seguir indicados.

3.2.1 Cor

A determinação da cor das farinhas foi realizada com o colorímetro Konica Minolta CR-400, no iluminante C, tendo os resultados sido expressos no modo CIELab, avaliando-se as coordenadas L^* , a^* , b^* , C^* e h as quais representam:

- A coordenada L^* corresponde à luminosidade e pode variar entre 0 (preto) a +100 (branco);
- A coordenada a^* que varia entre o vermelho (valores positivos de a^*) e o verde (valores negativos de a^*);
- A coordenada b^* que varia entre o amarelo (valores positivos de b^*) e o azul (valores negativos de b^*);
- O C^* indica a pureza ou intensidade da cor. Um maior valor deste parâmetro indica maior pureza ou intensidade da cor;
- O h refere-se à tonalidade, ou seja, à cor propriamente dita.

Para se medir a cor das “farinhas de azeitona” no equipamento referido colocaram-se as amostras numa placa de Petri, preenchendo de forma uniforme o fundo da placa. Posteriormente, e após calibração do aparelho através de um padrão branco de referência, o colorímetro foi colocado sobre a amostra para se proceder à medição dos valores de cada coordenada.

3.2.2 Composição nutricional

3.2.2.1 Humidade

O teor de humidade das azeitonas de mesa utilizadas na elaboração das farinhas foi avaliado através da perda de peso obtida por liofilização. Antes da liofilização das azeitonas, estas foram devidamente descaroçadas e pesadas. Pesaram-se 100 g de azeitona em cada caixa, devidamente identificada com o peso e com o tipo de azeitona que esta continha. Posteriormente, as placas foram colocadas a liofilizar até as azeitonas se encontrarem desidratadas.

Para se determinar a percentagem de humidade utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Ps}}{\text{Toma de amostra}} \times 100$$

Sendo: Pf = Peso da caixa mais o peso da amostra fresca;

Ps= Peso final da caixa com a amostra seca.

3.2.2.2 Gordura total

O teor de gordura total nas “farinhas de azeitona de mesa” foi determinado segundo o método AOAC 948.22 (2000), onde para a realização do ensaio, foram pesadas 5g de

amostra que foi colocada num almofariz com uma pequena porção de sulfato de sódio anidro (apenas por precaução, para remover alguma humidade que ainda possa existir e/ou que tenha sido absorvida pelas amostras, bem como ajudar na maceração, uma vez que as amostras já se encontravam liofilizadas). Após a maceração, transferiu-se o conteúdo existente no almofariz para um cartuxo de papel de filtro. Recorreu-se também à utilização de uma pequena porção de algodão para ajudar a limpar e a remover qualquer vestígio que tenha permanecido no almofariz, sendo o algodão também colocado no interior do cartuxo. Por último, o cartuxo foi devidamente identificado, fechado e colocado no extractor Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente de extração, durante 24 horas. Os balões de fundo redondo colocados no extractor para recolha da gordura foram previamente secos numa estufa a 105 °C.

Após a conclusão das 24 horas de extração, os balões retirados do Soxhlet correspondentes a cada um dos cartuxos, foram levados a um evaporador rotativo (Stuart Re300) para evaporar todo o solvente, e posteriormente colocados numa estufa (Binder c170) a 50 °C, até estabilização do peso. O resultado da gordura extraída das farinhas de azeitona foi expresso em percentagem de gordura utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor de gordura (\%, p. s.)} = \frac{P_f - P_i}{\text{Toma da amostra expressa em peso seco}} \times 100$$

Sendo: P_f = Peso final do balão com gordura;

P_i = Peso inicial do balão.

3.2.2.3 Proteína

O teor de proteína nas “farinhas de azeitona de mesa” foi determinado segundo o método de Kjeldahl (AOAC 920.152; 2000). Para a realização deste método pesaram-se 1g de amostra para um tubo de digestão. A esse tubo foi-lhe adicionada uma pastilha de catalisador Kjetabs Cx, que tem na sua composição 5g de sulfato de potássio e 0,5g de sulfato de cobre II, tendo-se posteriormente acrescentado 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

Após esta preparação no tubo deu-se início à segunda fase do processo, onde o tubo é colocado num bloco digestor a uma temperatura de 400 ± 50 °C até todas as amostras estarem devidamente digeridas. De seguida, deixaram-se as amostras arrefecer para poderem ser colocadas no sistema de destilação / titulação de Kjeldahl (Velp Scientifica UDK 152).

Neste sistema é possível adquirir os valores percentuais de azoto total, os quais são posteriormente convertidos em proteína bruta. O fator de conversão utilizado foi o 6,25. Assim sendo, os valores obtidos na determinação da proteína das “farinhas de azeitona de mesa” foram expressos em percentagem de proteína bruta em peso seco.

3.2.2.4 Cinzas

O teor de cinzas das “farinhas de azeitona de mesa” foi determinado segundo o método AOAC 940.26 (2000). Foram utilizados cadinhos previamente calcinados durante 2 horas, a 550 °C, nos quais se colocaram 2g de amostra. Os cadinhos com as amostras foram colocados na mufla a 550±15 °C até se obterem cinzas com uma cor branca. Após esse período, os cadinhos foram colocados num exsiccador de vidro até arrefecerem para posteriormente se poder realizar as pesagens.

O teor de cinzas, expresso em percentagem por matéria seca, foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de cinzas (\%, p. s.)} = \frac{P_f - P_i}{\text{Toma da amostra expressa em peso seco}} \times 100$$

Sendo: P_f = Peso final do cadinho com cinzas;

P_i = Peso inicial do cadinho.

3.2.2.5 Hidratos de carbono

O teor em hidratos de carbono existente nas “farinhas de azeitona de mesa”, expresso em peso seco, foi calculado depois de se terem determinado os teores percentuais de gordura, proteína e cinzas.

Assim sendo, para se calcular a percentagem de hidratos de carbono teve-se em consideração a seguinte equação:

$$\text{Hidratos de carbono (\%, p. s.)} = 100 - \%Gordura - \%Proteína - \%Cinzas$$

Sendo as percentagens de gordura, proteína e cinzas expressas em matéria seca.

3.2.2.6 Valor energético

O valor energético das “farinhas de azeitona de mesa” foi calculado depois de se ter determinado as percentagens dos teores de gordura, proteína e hidratos de carbono. Desta forma, para se calcular o valor energético dos produtos desenvolvidos utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Valor energético} \left(\frac{\text{kcal}}{100 \text{ g p. s.}} \right) = 4 \times [\% \text{Hidratos de carbono} + \% \text{Proteína}] + 9 \times \% \text{Gordura}$$

Sendo as percentagens de gordura, proteína e cinzas expressas em matéria seca.

3.2.3 Caracterização da fração lipídica

A gordura extraída das “farinhas de azeitona de mesa” foi analisada em termos do perfil em ácidos gordos e tocoferóis, tal como descrito nas secções seguintes.

3.2.3.1 Perfil em ácidos gordos

Para a realização deste método, procedeu-se novamente à extração da gordura de cada amostra, no Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente e um tempo de extração de 6 horas. Ao solvente foi adicionado 0,01% de BHT (di-*tert*-butil metil fenol), o qual é um antioxidante sintético que impede a oxidação da gordura. Foram novamente preparados cartuchos, em duplicado, onde se colocaram 3g de farinha de azeitona e uma pequena porção de sulfato de sódio anidro.

Após 6 horas de extração, o balão com a gordura foi recolhido e o éter ainda existente foi evaporado, recorrendo a um evaporador rotativo (Stuart RE 3000), a 35°C.

Para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos procedeu-se a uma transesterificação alcalina a frio, seguindo a metodologia descrita no Regulamento Delegado (UE) 2015/1830 da Comissão, de 8 de Julho. Desse modo, colocaram-se 2 ml de *n*-heptano num vial de 4 ml e seguidamente adicionaram-se 50 µl de extrato lipídico. A solução foi misturada, e posteriormente foram adicionados 200 µl de solução de KOH 2M em metanol. A solução resultante da mistura foi agitada durante cerca de 1 minuto e deixou-se repousar até que a fase superior ficasse límpida. Transferiu-se cerca de 1 ml da fase orgânica para um vial adaptável ao injetor automático do cromatógrafo gasoso (GC).

O equipamento utilizado consistiu num cromatógrafo gasoso com injetor automático e detecção por ionização de chama (GC/FID). Foi utilizada uma coluna capilar CP-Sil-88 de 50 m de comprimento, 0,25 µm de diâmetro interno e 0,19 µm de espessura de filme (Varian). Para uma separação efetiva dos diversos ácidos gordos utilizou-se um gradiente de temperatura de 140 a 220 °C, com uma rampa de temperaturas de 5 °C/min.

A recolha e o tratamento dos dados foram realizados pelo programa CP Maitre Chromatography Data System, Versão 2,5 (Chrompack International B.V.).

Os resultados foram expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico da amostra com uma mistura padrão de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco-37 FAME Mix).

3.2.3.2 Perfil em tocoferóis

Segundo a ISO 9936:2006, a concentração de vitamina E pode ser obtida por determinação do teor de tocoferóis (α , β , γ e δ) e tocotrienóis existentes nas “farinhas de azeitona de mesa”. Esta determinação é feita por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e deteção por fluorescência.

Utilizou-se um cromatógrafo da marca Jasco, equipado com uma bomba (Modelo PU-980), um injetor automático modelo AS2057 Plus e uma câmara de mistura HG-980-30. A deteção foi efetuada nos comprimentos de onda de 290 nm (excitação) e 330 nm (emissão) por fluorescência recorrendo ao modelo FP2020 Plus.

Para se proceder à separação dos tocoferóis (α , β , γ e δ) e dos tocotrienóis utilizou-se uma mistura de hexano: dioxano como eluente, numa coluna de sílica de fase normal Supelcosil LC-SI (Supelco), à temperatura ambiente (23 °C).

A quantificação dos compostos foi realizada pelo método do padrão interno, utilizando a resposta do sinal de fluorescência, onde as soluções de tocoferóis foram calibradas em função da absorvidade molar.

3.2.4 Atividade antioxidante

3.2.4.1 Preparação dos extratos para a determinação da atividade antioxidante e do perfil fenólico

Prepararam-se extratos a partir das “farinhas de azeitona” verdes, mistas e pretas. Para isso, pesou-se 1,5g de amostra, numa balança eletrónica modelo Acculab ALC-210.4, à qual foi adicionado 50 ml de metanol. A mistura foi colocada sobre uma placa

de agitação, tendo-se procedido à mistura da solução durante uma hora. Passado esse tempo, a amostra foi filtrada através de papel de filtro Whatman N°4 para um balão volumétrico que estava devidamente envolvido em papel de alumínio e previamente pesado. As substâncias que ficaram retidas no filtro de papel foram retiradas com 50 ml de metanol e levadas novamente à agitação durante mais uma hora. Este procedimento foi repetido três vezes.

Por fim, o balão volumétrico foi levado ao evaporador rotativo (Stuart RE 3000) a 35 °C, onde o metanol foi todo evaporado. Após determinação dos extratos obtidos por pesagem, os mesmos foram dissolvidos em metanol para obter uma concentração de 50 mg extrato/ml. Esta solução foi utilizada para determinar a atividade antioxidante através da capacidade sequestradora dos radicais livres DPPH e ABTS^{•+}, capacidade redutora total, diferentes grupos fenólicos e perfil fenólico por HPLC-DAD.

3.2.4.2 Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

A atividade antioxidante das “farinhas de azeitona de mesa” foi determinada utilizando o método do efeito bloqueador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Hatano *et al.* (1988), a qual avalia a capacidade que a amostra tem em sequestrar o radical livre DPPH estável de cor púrpura reduzindo-o a hidrazina (cor amarelo pálido).

A determinação da capacidade bloqueadora aos radicais livres de DPPH consistiu em misturar 0,3 ml de amostra (para o branco utilizaram-se 0,3 ml de metanol) e 2,7 ml de solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/l). Para preparar a solução de DPPH, foram pesadas 2,4 mg de DPPH em 100 ml de metanol.

Após a adição da amostra e do DPPH no tubo de ensaio, este foi agitado vigorosamente no vortex e colocado durante uma hora, no escuro, à temperatura ambiente. Após essa hora de repouso no escuro deu-se início à leitura da absorvância a 517 nm no espectrofotômetro UV-Visível.

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do efeito bloqueador do DPPH, calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Efeito bloqueador do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs Amostra}}{\text{Abs DPPH}} \times 100$$

Sendo:

Abs DPPH = Absorvância da solução de DPPH sem amostra

Abs Amostra = Absorvância da solução de DPPH com amostra

3.2.4.3 Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

Para medir a capacidade antioxidante total das “farinhas de azeitona de mesa” recorreu-se ao método de avaliação da atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} (radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Este método tem como base avaliar a capacidade que uma amostra tem de inibir este radical comparando-o com um antioxidante padrão e permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

Para a realização deste método preparou-se uma solução de 96,019 mg de ABTS dissolvidos em 25 ml de água destilada. Preparou-se também uma solução com 0,3784 mg de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) dissolvidas em 10 ml de água destilada. Desta solução, retiraram-se 0,440 ml e adicionou-se à solução de ABTS. A mistura foi colocada a reagir durante 12 a 16 horas no escuro, à temperatura ambiente.

Após ajustamento da absorvância a 734 nm da solução de ABTS com etanol absoluto a um valor compreendido entre 0,700± 0,020, a cada 100 µL da solução de extrato das “farinhas de azeitona de mesa” (2 mg de extrato/ml) foram adicionados 2 ml da solução de ABTS para um tubo de vidro, onde após agitação em vortex, ocorreu a reação durante 6 min. Após esse tempo, a absorvância a 734 nm foi determinada num espectrofotómetro UV-Visível. Cada amostra foi analisada em triplicado.

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}, calculada a partir da seguinte equação:

Atividade Sequestradora do Radical Livre ABTS^{•+} (%)

$$= \frac{\text{Abs ABTS}^{\bullet+} - \text{Abs Amostra}}{\text{Abs ABTS}^{\bullet+}} \times 100$$

Sendo:

Abs ABTS^{•+} = Absorvância da solução de ABTS^{•+}

Abs Amostra = Absorvância da solução de ABTS^{•+} com a amostra

3.2.4.4 Capacidade redutora total

Para a determinação da capacidade redutora total, recorreu-se ao método espectrofotométrico descrito por Singleton and Rossi (1965) com algumas modificações.

Num tubo de ensaio colocaram-se 1 ml da solução de extrato e 1 ml da solução de Folin-Ciocalteu (os compostos com capacidade redutora formam um complexo azul esverdeado). Após agitação no vortex, os tubos ficaram em repouso durante 3 minutos. Em simultâneo, foi preparado um branco, tendo a amostra sido substituída por 1ml de metanol.

De seguida, foram adicionados 1 ml de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) saturada e 7 ml de água destilada. Após a agitação no vortex, a solução ficou em repouso, no escuro, por 1 hora e 30 minutos. De seguida, leram-se as absorvâncias no espectrofotómetro UV-Visível ao comprimento de onda de 725 nm. Cada ensaio foi feito em triplicado. A curva de calibração foi preparada com ácido gálico, tendo os resultados sido expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extrato.

3.2.4.5 Diferentes grupos fenólicos

A determinação dos diferentes grupos fenólicos nas “farinhas de azeitona de mesa” foi efetuada por espectrofotometria, recorrendo a um espectrofotómetro UV-Visível de acordo com a metodologia descrita por Boulanouar et al. (2013).

Para a realização desta análise, colocaram-se num tubo de ensaio, 1 ml de amostra com a concentração de 1 mg de extrato/ml e 1 ml de etanol a 96% (v/v) / 0,1% HCl.

Posteriormente, completou-se o volume do tubo até 10 mL com a solução HCl a 2%, agitou-se devidamente e deu-se início à leitura das absorvâncias, a qual foi realizada a diferentes comprimentos de onda (280, 320 e 360 nm). Preparou-se uma curva de calibração com ácido gálico ao comprimento de onda de 280 nm, tendo os resultados sido expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g extrato. Foram também realizadas curvas de calibração com ácido cafeico para a absorvância a 320 nm, e com quercetina para a absorvância a 360 nm.

3.2.4.6 Perfil fenólico por HPLC-DAD

Para se proceder a esta análise, repetiu-se a extração da alínea 3.2.4.1. Após obtenção do extrato, transferiu-se o conteúdo do balão para os vials. Todas as amostras tiveram que ser filtradas através de um filtro de membrana de Nylon 0,2 μm (Whatman).

O perfil fenólico das “farinhas de azeitona de mesa” foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), num módulo de separação Knauer SmartLine, equipado com um sistema de injeção automática “Knauer Smartline autosampler 3800”, arrefecido a 4 °C, e com um detetor de díodos (DAD). Os dados foram obtidos através do software ClarityChrom®.

Para se conseguir a separação dos compostos recorreu-se à utilização de uma coluna C18 Nucleosil (Macherey-Nagel) de fase reversa (Spherisorb ODS2) com um diâmetro de partícula de 250 × 4 mm id, 5 µm, mantida a 30 °C (através de um forno de aquecimento).

A separação foi feita com recurso a um sistema de gradiente, composto pelos seguintes solventes: água/ácido fórmico (19:1) (A) e metanol (B). O fluxo foi de 0,9 ml/min com o seguinte gradiente: 5% de B aos 0 min, 15% de B aos 3 min, 25% de B aos 13 min, 30% de B aos 25 min, 35% de B aos 35 min, 40% de B aos 39 min, 45% de B aos 42 min, 45% de B aos 45 min, 47% de B aos 50 min, 48% de B aos 60 min, 50% de B aos 64 min e 100% de B aos 66 min.

Foram injetados, de cada solução, 20 µl e os dados cromatográficos foram registados a 280 nm e a 330 nm. Os dados espectrais de todos os picos foram acumulados na gama dos 200-400 nm, e a identificação dos compostos fenólicos foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros dos picos cromatográficos com os de padrões analisados sob as mesmas condições.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através do registo das absorvâncias nos cromatogramas e de retas de calibração preparadas a partir de padrões externos.

3.3 Preparação e caracterização das maioneses com “farinha de azeitona de mesa”

Na preparação de maioneses com adição de “farinhas” obtidas a partir de azeitonas de mesa com diferentes graus de maturação, foi seguida a seguinte receita: 400 ml de óleo, 20 ml de vinagre de vinho branco, 2 ovos inteiros e 5 ml de sumo de limão (comprado no supermercado para não haver variação significativa na acidez do produto final). Após preparação das maioneses procedeu-se à adição da “farinha de azeitona de mesa” numa proporção igual a 4%. Para cada tipo de azeitona foram preparados 3 lotes,

sendo feito também um controlo sem qualquer adição de farinha. Depois da preparação das maioneses com a “farinha”, foram feitas as determinações a seguir indicadas.

3.3.1 Características físico-químicas

3.3.1.1 Cor

A determinação da cor das maioneses foi realizada seguindo o mesmo método que se utilizou nas “farinhas de azeitona” (ver secção 3.2.1). Uma vez que a maionese é um produto pastoso, só foi possível medir estes parâmetros com a utilização de um acessório específico do colorímetro usado para amostras pastosas/líquidas. Desta forma foi possível mergulhar o colorímetro nas amostras de maionese para assim determinar a sua cor.

3.3.1.2 Textura

A textura das maioneses foi avaliada utilizando um texturómetro Stable Micro Systems com o *probe* designado “*Backward Extrusion Rig*”, que consiste num disco de 35 mm de diâmetro, tendo sido utilizada a célula de carga de 5 kg.

O disco de extrusão foi posicionado no centro do recipiente, o qual continha a amostra a analisar (altura igual a 45 mm de produto). O disco foi colocado a 20 mm acima da amostra, penetrando nesta 30 mm, a uma velocidade igual a 1 mm/s. De referir que para efeito de comparação entre amostras, o *probe*, ao fim de cada teste, regressou à posição inicial, ficando acima das amostras (20 mm). De salientar que quando o *probe* estava em posição de testar outra amostra, este foi devidamente limpo para não haver contaminação entre amostras. De forma a evitar a movimentação do recipiente com a maionese quando o *probe* estava a realizar o movimento ascendente, teve-se o cuidado de segurar o recipiente com o intuito de evitar a sua deslocação devido à resistência das amostras à saída do disco.

Os dados obtidos foram os seguintes: (i) pico ou força máxima correspondente à firmeza; (ii) área positiva da curva até ao pico ou força máxima indicativa da consistência; (iii) força negativa máxima correspondente à coesividade; e (iv) área da região negativa referente ao “trabalho de coesão”, indicativa de uma maior resistência à retirada do *probe* da amostra e da sua consistência/viscosidade. Estes resultados foram obtidos através do software Exponent.

3.3.1.3 Viscosidade

A viscosidade das maioneses foi avaliada recorrendo a um viscosímetro rotacional (Myr V1-L), onde se utilizou o *spindle* L4. A viscosidade (mPa.s) nas maioneses foi lida a diferentes rotações por minuto (0,3; 0,5; 0,6; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; e 10 rpm). Estas rotações foram determinadas tanto para a curva da carga (velocidade rotacional a aumentar desde as 0,3 até 10 rpm) como para a curva da descarga (velocidade rotacional a diminuir desde as 10 rpm até às 0,3 rpm). Em todas as medições foi também registada a temperatura.

3.3.1.4 Atividade da água (a_w)

Para a avaliação da a_w nas maioneses foi utilizado um analisador da atividade da água (Labswift), onde se colocaram as amostras de maionese nas caixas plásticas próprias para se proceder à sua determinação. Antes de se iniciar a leitura dos valores da a_w , procedeu-se à calibração do equipamento.

3.3.1.5 pH

A determinação do pH nas maioneses foi realizada por potenciometria. O equipamento utilizado foi o potenciómetro Hanna HI 99163. Este equipamento foi previamente calibrado, utilizando-se soluções tampão comerciais de pH = 7,01 e 4,01.

Esta análise foi realizada em triplicado, e entre cada tipo de maionese (maionese controlo, maionese com “farinha de azeitona verde”, maionese com “farinha de azeitona mista” e maionese com “farinha de azeitona preta”), o elétrodo de pH e a sonda de temperatura que penetravam as amostras foram lavados devidamente com água destilada para não haver transferência indesejada entre os diferentes tipos de maionese.

3.3.1.6 Humidade

O teor de humidade das diferentes maioneses foi determinado por liofilização, seguindo o método descrito na Secção 3.2.2.1.

3.3.1.7 Gordura total

A determinação do teor de gordura nas maioneses foi feita de acordo com o método AOAC 948.22 (2000), já explicado na parte referente à determinação do teor de gordura

nas farinhas de azeitona (Secção 3.2.2.2). Contudo, algumas alterações foram realizadas para melhor adaptação do método. O tempo de extração foi de apenas 6 horas e pesaram-se 2,5g de amostra, a qual após pesagem foi macerada com sulfato de sódio anidro para retirar a humidade existente.

3.3.1.8 Cinzas

A determinação do teor de cinzas das diferentes maioneses foi realizada como descrito na parte da determinação do teor de cinzas das “farinhas de azeitona de mesa” (Secção 3.2.2.4).

3.3.2 Fração lipídica

3.3.2.1 Perfil em ácidos gordos

Nas maioneses a determinação do perfil em ácidos gordos foi efetuada de igual forma como nas “farinhas de azeitona” (ver Secção 3.2.3.1), variando apenas a quantidade de amostra utilizada. Nas maioneses pesaram-se 2,5g de amostra.

3.3.2.2 Perfil em tocoferóis

Seguiu-se o mesmo procedimento ao anteriormente descrito na Secção 3.2.3.2.

3.3.3 Atividade antioxidante

3.3.3.1 Preparação da amostra para a determinação da atividade antioxidante e do perfil fenólico

Para a preparação dos extratos das maioneses (maionese controlo, maionese com “farinha de azeitona verde”, maionese com “farinha de azeitona mista” e maionese com “farinha de azeitona preta”) levou-se as amostras ao frio para haver a formação de duas fases, uma sólida e outra líquida/oleosa, a qual foi retirada para a realização das análises.

3.3.3.2 Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

Nas maioneses o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH foi determinado segundo o método utilizado nas farinhas de azeitona (ver Secção 3.2.4.2). Contudo, a

quantidade de amostra utilizada nas maionese foi diferente da usada nas farinhas. Nas maionese utilizou-se 10 μL de amostra com 290 μL de metanol.

3.3.3.3 Capacidade redutora total

Para determinar a capacidade redutora total nas maionese, primeiro fez-se a separação das maionese em duas fases. Para isso, pesaram-se 2,5 g de cada amostra de maionese num tubo de Falcon, adicionaram-se 2,5 ml de metanol, 2,5 ml de *n*-hexano e centrifugou-se, obtendo-se duas fases (fase superior e fase inferior) (Figura 4).

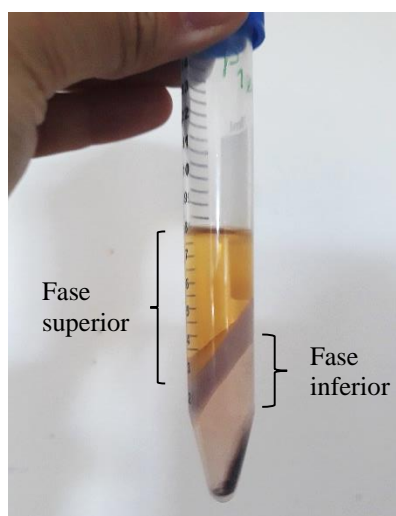


Figura 4: *Tubo de Falcon demonstrativo da separação de fases.*

A determinação da capacidade redutora total foi feita, numa primeira etapa, na fase superior de todas as maionese, tendo-se posteriormente feito também na fase inferior. O método utilizado foi o descrito na Secção 3.2.4.4.

3.3.3.4 Perfil fenólico por HPLC-DAD

A determinação do perfil fenólico nas maionese foi realizada aplicando o mesmo método e processo utilizado na determinação do perfil fenólico nas “farinhas de azeitona” (ver Secção 3.2.4.6). O que diferiu das maionese foi que os dados cromatográficos foram registados apenas a 280 nm.

3.3.4 Parâmetros de qualidade

3.3.4.1 Índice de peróxidos

Para a determinação do índice de peróxidos nas maioneses seguiu-se o Anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de julho de 1991.

O procedimento consistiu em pesar rigorosamente 1,2 g de amostra de maionese para dentro de um frasco de Erlenmeyer. Após pesagem, adicionou-se, pela seguinte ordem: 10 ml de clorofórmio; 15 ml de Ácido Acético Glacial; 1 ml de solução saturada Iodeto de Potássio. Tapa-se o franco com parafilme e agita-se durante 1 minuto. Deixa-se em repouso, no escuro, durante 5 minutos e posteriormente adiciona-se 75mL de H₂O destilada, para parar a reação, e 4 gotas de cozimento de amido.

Por fim, titulou-se com tiosulfato de sódio (0,01N) até ficar transparente.

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

Sendo que:

V: volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação (ml);

N: normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio;

m: massa da amostra em gramas.

3.3.4.2 Análise por espectrofotometria no ultravioleta

A análise da absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 da Comissão de 12 de outubro de 2015, onde aproximadamente 0,6g 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, 264, 268 e 272 nm) 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, 268 nm e ΔK foram calculados da seguinte forma:

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

$$K_{268} = \frac{A_{268}}{c \times l}$$

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

Sendo:

A_{232} e A_{268} : absorvâncias nos respectivos comprimentos de onda;

c : concentração da solução, em g/100 ml;

l : percurso ótico na célula de quartzo (1 cm).

Em todas as situações, os resultados foram arredondados às centésimas.

3.3.5 Análise sensorial

Para verificar a aceitação do consumidor em relação às maioneses enriquecidas com “farinha de azeitona de mesa”, foram realizadas diferentes provas com provadores voluntários não treinados (estudantes, professores e funcionários) da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. A cada provador foi entregue quatro amostras diferentes devidamente codificadas e um questionário por amostra.

No questionário, era pedido aos provadores para fazerem a avaliação numa escala hedónica não estruturada de 10 cm (0 – “extremamente desagradável”, 9 – “extremamente agradável”) onde foram avaliados os parâmetros cor, aparência, aroma, textura, paladar, doçura, salgado, amargo, ácido (e suas quantificações) e apreciação global do produto.

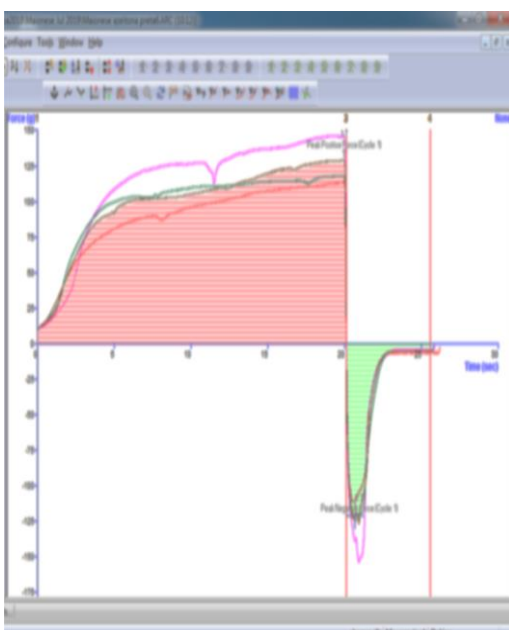
No fim do questionário foi colocada uma questão sobre a intenção de compra do provador, se a resposta fosse “não”, solicitava-se ao provador uma justificação.

3.4 Análise estatística

O programa utilizado na análise estatística, foi o Minitab (versão 14). Começou-se por avaliar a normalidade e a homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente. Verificou-se que os dados se mostraram normais. Quando se observou homogeneidade de variâncias, aplicou-se a ANOVA. Seguidamente, no caso de existirem diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey. Nas situações em que não se observou homogeneidade de variâncias, aplicou-se a ANOVA-Welch, para detetar diferenças significativas entre amostras. Na situação em que isso ocorreu, aplicou-se de seguida o teste de Games-Howell.

CAPÍTULO 4

Resultados e discussão



4. Resultados e discussão

Para proceder à caracterização das farinhas e das maioneses, foram feitas várias determinações físico-químicas e sensoriais. Os resultados encontram-se estruturados em dois tópicos distintos. No primeiro tópico apresentam-se os resultados obtidos na caracterização das “farinhas de azeitona” nomeadamente ao nível da cor, composição nutricional (gordura, proteína, cinzas, hidratos de carbono e valor energético), fracção lipídica (perfis em ácidos gordos e tocoferóis) e atividade antioxidante (efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}, capacidade redutora total, diferentes grupos fenólicos e perfil fenólico por HPLC-DAD).

No segundo tópico são apresentados os resultados obtidos para as maioneses com “farinha de azeitona”, no que se refere a características físico-químicas como a cor, textura, viscosidade, atividade da água, pH, humidade, gordura total e cinzas. Posteriormente, avaliaram-se a fração lipídica (ácidos gordos e tocoferóis), a atividade antioxidante (efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, capacidade redutora total e perfil fenólico por HPLC-DAD) e parâmetros de qualidade (índice de peróxidos e análise por espectrofotometria no ultravioleta). Por fim, fez-se a análise sensorial para caracterizar o perfil sensorial das diferentes maioneses feitas com adição de diferentes “farinhas de azeitona”.

4.1 Caracterização físico-química e biológica das “farinhas de azeitona”

4.1.1 Cor

A cor dos alimentos é dos primeiros parâmetros a serem avaliados pelo consumidor, podendo ditar o destino do produto. Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios relativos aos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h , determinados nas diferentes “farinhas de azeitona de mesa”, tendo-se obtido diferenças significativas em todos eles ($p < 0,05$). Pôde-se verificar que os valores correspondentes à coordenada L^* variaram entre 35,8 e 49,2, tendo os valores mais elevados sido obtidos para a “farinha de azeitona verde”, indicando que esta amostra tem uma maior luminosidade em comparação com as restantes farinhas. A “farinha de azeitona preta” apresentou um menor valor de luminosidade, uma vez que a sua cor se aproxima do preto. A cor preta pode estar diretamente relacionada com o teor de antocianinas e compostos fenólicos presentes. Segundo Fernandez-Orozco *et al.* (2011), estes componentes fazem com que essas

azeitonas sejam mais escuras. Por consequência o seu valor de luminosidade vai ser mais baixo.

Tabela 3: Valores médios e respectivo desvio padrão dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h determinados nas diferentes “farinhas de azeitona”

Farinhas de Azeitona	Parâmetros Avaliados				
	L^*	a^*	b^*	C^*	h
Verde	49,2±5,5 ^c	3,6±0,6 ^a	24,9±2,8 ^c	25,2±2,7 ^c	81,5±2,3 ^c
Mista	43,7±4,3 ^b	6,3±0,1 ^b	16,7±2,6 ^b	17,8±2,5 ^b	68,9±3,1 ^b
Preta	35,8±1,5 ^a	11,6±0,4 ^c	5,4±1,0 ^a	12,8±0,4 ^a	25,0±4,4 ^a
<i>p-value</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Relativamente à coordenada a^* , verificou-se que a “farinha de azeitona verde” foi aquela que apresentou o valor mais baixo (3,6), indicativo de uma cor avermelhada pouco intensa. Pelo contrário, a “farinha de azeitona preta” foi aquela que apresentou valores de a^* mais elevados (11,6), indicando que esta farinha apresenta um tom mais avermelhado que as restantes.

No que respeita à coordenada b^* , observou-se que a “farinha de azeitona preta” foi aquela que apresentou um valor significativamente mais baixo (5,4), comparativamente às restantes farinhas, indicando assim que o seu tom é menos amarelado do que o da “farinha de azeitona verde”. Pelo contrário, esta foi a que apresentou o valor de b^* mais elevado (24,9).

Relativamente ao croma (intensidade da cor, avaliada pelo parâmetro C^*), a “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou a maior pureza ou intensidade da cor, seguida das “farinhas de azeitona mista e preta”.

Tal como era esperado, as três farinhas apresentaram tonalidades (valores de h) distintas, tendo em conta o aspeto visual das mesmas (Figura 5).

Farinha de azeitona verde

Farinha de azeitona mista

Farinha de azeitona preta



Figura 5: Aspeto visual das “farinhas de azeitona verde, mista e preta”.

4.1.2 Composição nutricional

Para avaliar a composição nutricional das “farinhas de azeitona” obtidas a partir de frutos em diferentes estados de maturação, foram determinados os teores de gordura, proteína e cinzas, sendo os resultados apresentados em percentagem de peso seco. Foram também determinados o teor de hidratos de carbono e o valor energético.

De referir que o teor de humidade das azeitonas verdes, mistas e pretas foram iguais a $73,2 \pm 0,3$; $70,8 \pm 0,3$; e $71,7 \pm 3,2\%$, respetivamente, detetando-se uma diferença significativa entre as azeitonas verdes e as mistas ($p=0,01$). Contudo, os teores de humidade eram elevados, acima dos 60%. Estes resultados indicam que a água é o componente maioritário na azeitona, indo de encontro aos valores referenciados por Nogueira (2012) para a azeitona de mesa produzida na região de Trás-os-Montes.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados referentes à composição nutricional das “farinhas de azeitona de mesa”. Verificou-se que relativamente ao teor de gordura,

este variou entre 60,2 e 67,3% (p.s.), sendo que o menor valor correspondeu à “farinha de azeitona verde”, não se detetando diferenças significativas entre as “farinhas obtidas a partir de azeitonas mistas e pretas”. Os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza aos indicados por Nogueira (2012) para azeitonas de mesa produzidas na região de Trás-os-Montes.

Tabela 4: Composição nutricional das “farinhas de azeitona de mesa”

Composição em:	“Farinha de azeitona de mesa”			<i>p-value</i>
	Verde	Mista	Preta	
Gordura (% p.s.)	60,2±2,6 ^a	64,3±2,3 ^b	67,3±1,9 ^b	<0,001
Proteína (% p.s.)	4,77±0,35 ^b	4,30±0,37 ^{a,b}	3,78±0,15 ^a	0,020
Cinzas (% p.s.)	14,99±0,03 ^b	13,58±0,05 ^a	13,85±0,01 ^a	<0,001
Hidratos de Carbono (% p.s.)	20,0±2,7 ^b	17,8±2,6 ^{a,b}	15,0±1,9 ^a	0,010
Valor energético (kcal/100g p.s.)	641±13 ^a	667±12 ^b	681±9 ^b	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Pelo contrário, para o teor de proteína bruta, foi observada uma diminuição da “farinha da azeitona verde” (4,77%, p.s.) para a mista e preta (4,30 e 3,78%, p.s., respetivamente).

Relativamente ao teor em cinzas, observou-se também que o seu teor foi mais elevado na “farinha de azeitona verde”, com um valor médio igual a 14,99% (p.s.), enquanto as restantes farinhas apresentaram valores de 13,58 e 13,85% (p.s.), referentes às “farinhas de azeitona mista e preta”, respetivamente.

No que respeita aos hidratos de carbono, o seu teor variou entre 15,0% (p.s.) para a “farinha de azeitona preta”, e 20,0% (p.s.) para a farinha de azeitona verde. Estes resultados mostram que à medida que aumenta a maturação das azeitonas, diminui o teor em proteína bruta e de hidratos de carbono.

Na determinação do valor energético, verificou-se que os seus teores variaram entre 641 e 681 kcal/100g (p.s.), sendo o valor mais baixo relativo à “farinha de azeitona verde” e o mais alto à “farinha de azeitona preta”. Contudo, este último valor não foi significativamente diferente do determinado na “farinha de azeitona mista”. Estes resultados devem-se ao facto destas duas “farinhas” serem aquelas que apresentaram maiores teores de gordura. Resultado idêntico foi mencionado por Ünal & Nergiz (2003),

que indicam um menor teor de gordura nas azeitonas verdes, comparativamente com as azeitonas pretas. Resultados semelhantes foram também observados por Antunes (2019).

4.1.3 Caracterização da fração lipídica

4.1.3.1 Perfil de ácidos gordos

Na Tabela 5 estão indicados os ácidos gordos que foram detetados nos três tipos de “farinha de azeitona” da cv. Cobrançosa, e respetiva percentagem relativa.

Tabela 5: Perfil em ácidos gordos (% relativa) determinado nas “farinhas de azeitona verde, mista e preta”.

Ácidos gordos	“Farinha de azeitona”			<i>p-value</i>
	Verde	Mista	Preta	
C16:0	11,88±0,04 ^a	12,39±0,12 ^b	12,82±0,19 ^c	<0,001
C17:0	0,21±0,01	0,22±0,01	0,20±0,01	0,194
C18:0	3,97±0,12 ^a	4,62±0,15 ^b	4,57±0,31 ^b	<0,001
C20:0	0,44±0,01	0,45±0,01	0,41±0,03	0,084
C22:0	0,12±0,01 ^c	0,11±0,01 ^b	0,10±0,01 ^a	0,002
C24:0	0,07±0,01 ^c	0,06±0,01 ^b	0,05±0,01 ^a	<0,001
SFA	16,74±0,15^a	17,89±0,23^b	18,20±0,19^c	<0,001
C16:1	0,92±0,01 ^a	1,03±0,01 ^b	1,21±0,05 ^c	<0,001
C17:1	0,26±0,01 ^c	0,25±0,01 ^b	0,24±0,01 ^a	<0,001
C18:1	71,89±0,29 ^c	68,20±0,39 ^b	66,20±0,35 ^a	<0,001
C20:1	0,47±0,01 ^b	0,36±0,07 ^{a,b}	0,31±0,14 ^a	0,042
MUFA	73,55±0,30^c	69,84±0,34^b	67,96±0,34^a	<0,001
C18:2	6,31±0,05 ^a	8,56±0,32 ^b	10,24±0,40 ^c	<0,001
C18:3	1,37±0,02 ^c	1,25±0,02 ^b	1,15±0,03 ^a	<0,001
C22:2	0,76±0,04 ^b	0,68±0,03 ^a	0,70±0,02 ^a	0,001
PUFA	8,43±0,07^a	10,50±0,32^b	12,10±0,39^c	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Relativamente aos ácidos gordos existentes nas “farinhas de azeitona”, verificou-se que o composto maioritário foi o ácido oleico (C18:1), com percentagens compreendidas entre os 66,20 e os 71,89%. O facto deste composto estar em maiores quantidades justifica as percentagens elevadas que se obtiveram para os ácidos gordos

monoinsaturados (MUFA). As percentagens mais elevadas de ácido oleico e MUFA foram determinadas na farinha de azeitona verde (71,89 e 73,55%, respetivamente), enquanto as mais baixas foram obtidas para a “farinha de azeitona preta” (66,20 e 67,96%, respetivamente).

Observou-se também que o ácido palmítico (C16:0) foi o segundo composto em maior proporção, a variar entre os 11,88 e os 12,82%. Tal facto justifica os valores relativos aos ácidos gordos saturados (SFA) terem sido os segundos mais elevados, cujos valores variaram entre 16,74 e 18,20%. De referir que a percentagem relativa mais elevada para os SFA correspondeu à “farinha de azeitona preta” e a mais baixa à “farinha de azeitona verde”.

Relativamente aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA), os valores estiveram compreendidos entre os 8,43 e os 12,10%. Destes ácidos fazem parte o ácido linoleico (C18:2c), com valores entre os 6,31 e os 10,24%, e o ácido linolénico (C18:3c) com valores entre 1,15 e 1,37%. De referir que nos PUFA, a percentagem maior correspondeu à “farinha de azeitona preta” e o valor mais baixo correspondeu à “farinha de azeitona verde”.

4.1.3.2 Perfil em tocoferóis

Na Tabela 6 estão representados os tocoferóis determinados nas “farinhas de azeitona” (verde, mista e preta). Foram detetados três tocoferóis na gordura extraída das “farinhas”, na proporção α -tocoferol > γ -tocoferol > β -tocoferol.

Tabela 6: Tocoferóis determinados nas farinhas de azeitona de mesa (verde, mista e preta) (mg/kg gordura).

Tocoferol	Farinhas de azeitona (mg/kg de gordura)			<i>p-value</i>
	Verde	Mista	Preta	
α -tocoferol	316±15 ^c	272±16 ^b	186±41 ^a	<0,001
β -tocoferol	5,2±0,2 ^a	7,4±0,3 ^b	8,1±1,0 ^b	<0,001
γ -tocoferol	15,9±1,2 ^c	10,4±0,5 ^b	8,0±0,4 ^a	<0,001
Total	337±16 ^c	290±16 ^b	202±42 ^a	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em relação às “farinhas” individuais, verificou-se que a “farinha de azeitona verde” foi aquela que apresentou os valores mais elevados de α -tocoferol (316±15 mg/kg

de gordura) e de γ -tocoferol ($15,9 \pm 1,2$ mg/kg de gordura), em comparação com os valores obtidos para as outras duas “farinhas”. Pelo contrário, a “farinha de azeitona verde” foi aquela, cujos valores de β -tocoferol ($5,2 \pm 0,2$ mg/kg de gordura) foram os mais baixos. Este tocoferol apresentou-se em maior quantidade na gordura presente na “farinha de azeitona preta” ($8,1 \pm 1,0$ mg/kg de gordura).

Assim sendo, e como se constata na Tabela 6, pode-se concluir que a gordura da “farinha de azeitona verde” foi aquela que apresentou o maior valor de tocoferóis (337 ± 16 mg/kg de gordura), seguida da gordura extraída da “farinha de azeitona mista” (290 ± 16 mg/kg de gordura). Pelo contrário, a gordura da “farinha de azeitona preta” foi aquela que na sua composição apresentou os valores mais baixos de tocoferóis (202 ± 42 mg/kg de gordura), incluindo o α - e γ -tocoferóis. Estes resultados indicam que a maturação das azeitonas influencia a quantidade de tocoferóis existentes, sendo que quanto mais madura é a azeitona, menos tocoferóis a sua gordura terá.

4.1.4 Atividade antioxidante

4.1.4.1 Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} e capacidade redutora total

A atividade antioxidante das diferentes “farinhas de azeitona” foi avaliada através do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} e da capacidade redutora total.

Relativamente ao efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (Figura 6), verificou-se que os valores variaram entre 78,1 e 90,5% de inibição, tendo os maiores valores sido obtidos na “farinha de azeitona verde”. Assim, verificou-se que à medida que aumenta a maturação, diminui o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, indicando que a capacidade antioxidante avaliada pelo sequestro destes radicais livres é maior em estados de maturação mais baixos, ou seja, nas “farinhas de azeitonas verdes”.

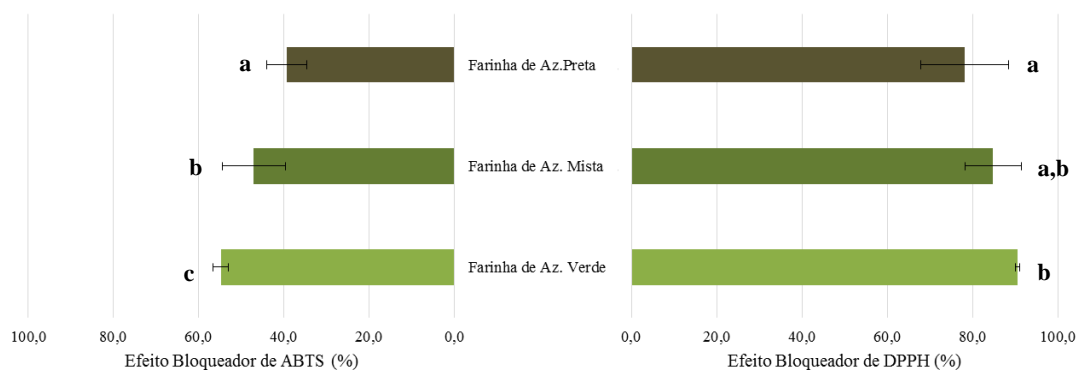


Figura 6: Percentagens de inibição obtidas para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e a atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} (em cada um dos ensaios aplicados, letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$))

A mesma tendência foi observada para a atividade sequestradora de radicais livres de ABTS^{•+} (Figura 6). Verificou-se que para este parâmetro, os valores variaram entre 39,3 e 54,8% de percentagem de inibição, tendo novamente a “farinha de azeitona verde” demonstrado a maior atividade sequestradora. Já as farinhas pretas apresentaram a menor atividade antioxidante.

Os resultados obtidos para a capacidade redutora total encontram-se representados na Figura 7.

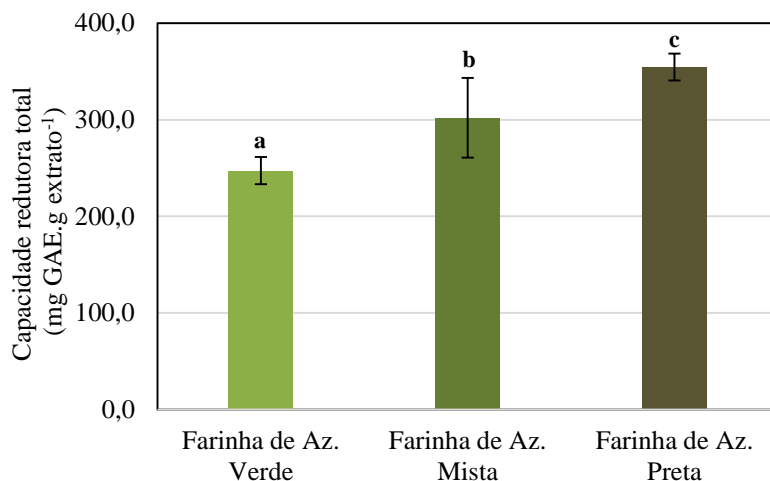


Figura 7: Capacidade redutora total das “farinhas de azeitona” (verde, mista e preta) (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$))

Relativamente à capacidade redutora total, observou-se que esta variou entre 247 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato para a “farinha de azeitona verde” e 354 mg

equivalentes de ácido gálico/g de extrato para a “farinha de azeitona preta”. Ao contrário do observado nos outros ensaios da atividade antioxidante, à medida que aumentou a maturação da azeitona, aumentou a capacidade redutora total. Estes resultados podem ser devidos ao facto de este ensaio avaliar a presença de compostos com capacidade redutora, não sendo unicamente específico para os compostos fenólicos. De facto, existem outros compostos que podem estar presentes nas azeitonas, que podem apresentar propriedades redutoras.

4.1.4.2 Diferentes grupos fenólicos

Os diferentes grupos fenólicos presentes nas “farinhas de azeitona verde, mista e preta” foram determinados por espectrofotometria a 280, 320 e 360 nm, recorrendo a um espectrofotómetro UV-Visível. Na Figura 8 encontram-se apresentados os resultados obtidos para as “farinhas de azeitona” (verde, mista e preta) para as referidas absorvâncias. Na absorvância a 280 nm, os valores foram expressos em mg de ácido gálico/g extrato, a 320 nm foram expressos em mg de ácido cafeico/g extrato e a 360 nm em mg de quercetina/g extrato.

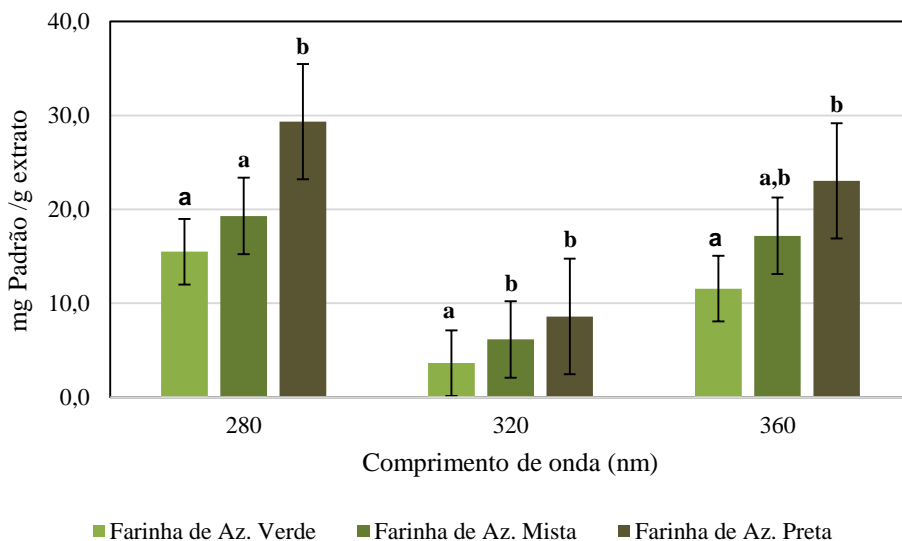


Figura 8: Diferentes grupos fenólicos avaliados aos comprimentos de onda de 280, 320 e 360 nm em “farinhas de azeitona verde, mista e preta” (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$)).

Conforme se pode verificar pela Figura 8, os compostos que predominaram nas “farinhas de azeitona” foram os que absorvem a 280 nm, correspondentes aos ácidos

hidroxibenzóicos e flavanóis, e a 360 nm, relativos aos flavonóis (Rodrigues, 2011b). Pelo contrário, as “farinhas de azeitona” apresentaram um menor teor em ácidos hidroxicinâmicos e stilbenos, avaliados a 320 nm (Rodrigues, 2011b). Ao comparar as “farinhas de azeitona” entre si, a “farinha de azeitona verde” foi aquela que apresentou valores mais baixos a 280 nm (15,5 mg de ácido gálico/g extrato), 320 nm (3,6 mg de ácido cafeico/g extrato) e a 360 nm (11,6 mg de quercetina /g extrato). Em contrapartida, a “farinha de azeitona preta” foi aquela que apresentou os maiores valores a 280, 320 e 360 nm, com valores médios iguais a 29,3 mg de ácido gálico/g extrato, 8,6 mg de ácido cafeico/g extrato e 23,0 mg de quercetina /g extrato, respetivamente.

4.1.4.3 Perfil fenólico

O perfil fenólico das “farinhas de azeitona de mesa da cv. Cobrançosa” foi determinado por HPLC-DAD. Foram identificados e quantificados 9 compostos, nomeadamente: hidroxitirosol, tirosol, derivados da oleuropeína, ácido clorogénico, verbascosídeo e um seu derivado, rutina, luteolina e apigenina. Na Tabela 7 estão apresentados os valores dos diferentes compostos nas três “farinhas de azeitona”.

Tabela 7: Perfil fenólico (mg/g matéria seca) das diferentes “farinhas de azeitona”

Compostos Fenólicos	Farinha de azeitona			p-value
	Verde	Mista	Preta	
Hidroxitirosol	2,23±0,11 ^c	1,60±0,27 ^b	1,02±0,04 ^a	<0,001
Tirosol	0,83±0,02 ^b	0,56±0,12 ^a	0,44±0,06 ^a	<0,001
Derivados da oleuropeína	0,31±0,03	ND	ND	--
Ácido clorogénico	ND	0,021±0,004 ^a	0,031±0,004 ^b	0,001
Derivado de verbascosídeo	ND	0,10±0,03 ^a	0,12±0,02 ^a	0,126
Verbascosídeo	ND	0,20±0,06 ^a	0,27±0,05 ^a	0,080
Rutina	0,12±0,03 ^a	0,11±0,02 ^a	0,13±0,01 ^a	0,108
Luteolina	0,49±0,01 ^b	0,46±0,02 ^{a,b}	0,42±0,03 ^a	0,003
Apigenina	0,054±0,002 ^b	0,039±0,002 ^a	0,041±0,003 ^a	<0,001
Total	4,04±0,16^c	3,09±0,32^b	2,47±0,19^a	<0,001

*ND – Não Detetado

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas (p< 0,05).

De todos os compostos identificados, o hidroxitirosol foi o composto maioritário em todas as “farinhas de azeitona”, variando entre 1,02 e 2,23 mg/g matéria seca. Resultados semelhantes foram verificados por Romero *et al.* (2004), Blekas *et al.* (2002), Pereira *et al.* (2006), e Malheiro *et al.* (2011). De acordo com estes autores, o hidroxitirosol é o composto fenólico que existe em maiores quantidades nas azeitonas de mesa. É um composto com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo já reconhecido pela FDA como um composto seguro, designado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (PubChem, 2020). A “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou o maior valor neste composto, seguida da “farinha de azeitona mista” e, por fim, da “farinha de azeitona preta”.

O segundo composto maioritário observado foi o tirosol, variando entre 0,83 e 0,44 mg/g matéria seca, sendo novamente obtido o valor mais elevado na “farinha de azeitona verde”. Entre as “farinhas de azeitona mista e preta” não foram detetadas diferenças significativas. Estes resultados, à semelhança do hidroxitirosol, mostram que à medida que avança a maturação da azeitona, vai diminuindo a quantidade destes compostos. O tirosol também apresenta atividade antioxidante e é um agente anti-arritmia (PubChem, 2020).

Como terceiro composto maioritário nas diferentes farinhas, destacou-se a luteolina com uma concentração entre 0,42 e 0,49 mg/g matéria seca, apresentando as “farinhas de azeitona verde e mista” os maiores valores. A luteolina é um flavonóide, com potencial antioxidante, anti-inflamatório e com atividades indutora de apoptose e quimiopreventiva (PubChem, 2020).

Observando a Tabela 7, verificou-se que um derivado da oleuropeína foi detetado na “farinha de azeitona verde”, não sendo detetado nem na “farinha de azeitona mista”, nem na “farinha de azeitona preta”. Pelo contrário, o ácido clorogénico, um derivado de verbascosídeo e o verbascosídeo, apenas foram detetados e quantificados nas “farinhas de azeitona mista e preta”, sendo na última farinha encontrados em maiores quantidades. Contudo, só no ácido clorogénico é que se observou uma diferença significativa entre as duas farinhas. O ácido clorogénico está ligado, em termos benéficos, à regulação da glucose e ao desenvolvimento dos diabetes tipo-2 (Tunnicliffe *et al.*, 2015), e o verbascosídeo está classificado como tendo atividade citostática ou antineoplástica, sendo um agente anti-infeccioso, imunossupressivo e antioxidante (PubChem, 2020).

A rutina e a apigenina foram os compostos detetados em menores quantidades nas “farinhas de azeitona de mesa”. Não foram observadas diferenças significativas entre as farinhas no que se refere à rutina. Contudo, observou-se um valor superior de apigenina na “farinha de azeitona verde” face às outras duas farinhas. A rutina é um vasoprotetor e a apigenina tem atividade biológica de inibição de crescimento de tumores e também atividade quimiopreventiva (PubChem, 2020).

De um modo geral, constatou-se que em termos do somatório destes compostos fenólicos, a sequência obtida foi a seguinte: “farinha de azeitona verde” > “farinha de azeitona mista” > “farinha de azeitona preta”. Contudo, todas as “farinhas de azeitona” elaboradas apresentaram compostos fenólicos com propriedades biológicas muito importantes para a saúde humana.

4.2 Caracterização físico-química e biológica das maioneses com “farinha de azeitona”

4.2.1 Cor

Relativamente aos valores obtidos para a cor das maioneses, pode-se observar na Tabela 8, em baixo representada, os valores médios e desvios padrão dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h , determinados através do colorímetro.

Tabela 8: Valores médios e respetivo desvio padrão dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h determinados nas maioneses com diferentes “farinhas de azeitona”

Maionese com “farinha de azeitona”	Parâmetros Avaliados				
	L^*	a^*	b^*	C^*	h
Controlo	88,2±1,1 ^c	-0,62±0,67 ^a	17,1±2,0 ^b	17,2±1,9 ^{b,c}	92,4±2,9 ^b
Verde	81,7±0,6 ^b	-0,43±0,20 ^a	18,2±0,3 ^b	18,2±0,3 ^c	91,3±0,6 ^b
Mista	76,6±18,8 ^{a,b,c}	0,72±1,58 ^b	14,4±7,0 ^{a,b}	16,0±0,9 ^b	102,9±54,4 ^{a,b}
Preta	77,9±0,6 ^a	3,03±1,17 ^c	10,5±0,7 ^a	11,0±0,7 ^a	73,9±1,7 ^a
<i>p-value</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em termos gerais, salvo raras exceções, a maionese com “farinha de azeitonas mistas” apresentou um maior desvio padrão para os parâmetros avaliados, em relação às restantes maioneses. Este facto pode dever-se à maior heterogeneidade observada na cor das azeitonas utilizadas na elaboração da farinha correspondente.

Conforme se verifica na Tabela 8, pode-se verificar que os valores correspondentes à coordenada L^* foram mais elevados para a amostra controlo (maionese padrão sem adição de “farinha de azeitona”). No entanto, comparando as três maioneses com adição de “farinha” observou-se que a maionese com adição de “farinha de azeitona verde”, foi a que apresentou o maior valor médio para a coordenada L^* . Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre essa maionese e a elaborada com “farinha de azeitona mista”. Estes resultados indicam que a maionese com “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou maior luminosidade, seguida pela maionese com adição de “farinha de azeitona mista” e, por fim, a maionese com adição de “farinha de azeitona preta”. No entanto, é de salientar que a maionese controlo foi aquela que apresentou maior luminosidade, demonstrando ser uma amostra mais clara do que as restantes.

Relativamente à coordenada a^* , pôde-se verificar que as maioneses controlo e com adição de “farinha de azeitona verde” foram aquelas que forneceram valores negativos, indicando que apresentavam uma cor mais próxima do tom verde. Pelo contrário, foi possível observar que a maionese com “farinha de azeitona preta” foi aquela que apresentou valores de a^* positivos e mais altos, demonstrando que esta amostra apresentou um tom mais próximo do avermelhado do que as restantes amostras de maionese. Este resultado está em linha com o anteriormente observado nas “farinhas de azeitona”.

No que diz respeito a coordenada b^* pode-se observar na tabela que as maioneses controlo e com “farinha de azeitona verde” foram aquelas cujos valores foram mais elevados, comparativamente às restantes amostras, indicando assim que o seu tom se aproxima mais do amarelo.

Relativamente ao croma (intensidade da cor, avaliada pelo parâmetro C^*), a “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou a maior pureza ou intensidade da cor, seguida das maioneses controlo e com “farinhas de azeitona mista e preta”. Este resultado foi idêntico ao anteriormente observado nas “farinhas de azeitona”.

Em relação à tonalidade, as quatro maioneses apresentaram tonalidades (valores de h) de certo modo distintas, principalmente a maionese com “farinha de azeitona preta”.

As maionese control e com “farinha de azeitona verde” apresentaram tonalidades semelhantes, tal como se pode constatar na Figura 9.



Figura 9: Aspeto visual das maionese control e com “farinhas de azeitona verde, mista e preta” (da esquerda para a direita).

4.2.2 Textura

A textura foi um dos parâmetros analisados nas maionese com o intuito de determinar diferenças entre as amostras e para avaliar se a adição de “farinha de azeitona” influenciava a textura das maionese. De facto, a textura é um parâmetro muito importante, uma vez que o consumidor frequentemente a avalia.

As determinações foram realizadas num texturómetro usando o método da “*back extrusion*”, tendo-se estimado a firmeza da maionese a partir da determinação da força positiva máxima aplicada. Quanto maior esta for, mais firme será a maionese. Além deste parâmetro, também se avaliaram os seguintes: (i) Área até à força máxima positiva (área positiva) que permite avaliar a consistência. Quanto maior for, mais espessa é a consistência da amostra; (ii) Força negativa máxima, indicativa da coesividade da amostra. Quanto mais negativo for o valor, mais “coesa” é a amostra; e (iii) Área negativa, a qual pode ser referida como o “trabalho de coesão” ou “índice de viscosidade”. Quanto maior for o seu valor, maior resistência é sentida à retirada da amostra, indicando o grau de coesão e também da viscosidade da amostra. Na Figura 10 estão representadas diversas curvas obtidas durante a avaliação da textura nas maionese.

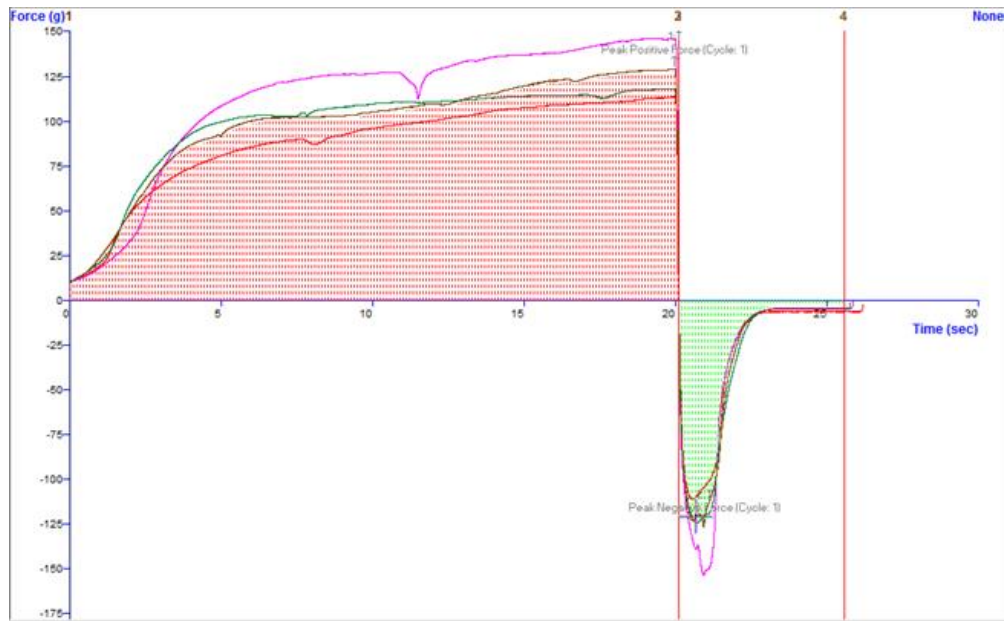


Figura 10: Exemplos de curvas obtidas no texturômetro durante a avaliação da textura das maioneses controle e com “farinhas de azeitona verde, mista e preta”.

Na Tabela 9 estão descritos os valores obtidos para os parâmetros anteriormente mencionados.

Tabela 9: Valores obtidos para os parâmetros relacionados com a textura e avaliados nas diferentes maioneses

Parâmetros Avaliados	Controlo	Maionese			p-value
		c/ Farinha de Azeitona Verde	c/ Farinha de Azeitona Mista	c/ Farinha de Azeitona Preta	
Força Positiva do pico (g)	109±6 ^a	139±9 ^b	120±2 ^{a,b}	127±10 ^{a,b}	0,007
Força Negativa do pico (g)	-101±9 ^b	-142±12 ^a	-124±5 ^{a,b}	-127±11 ^a	0,006
Área Positiva (g.s)	1641±115 ^a	2156±119 ^b	1919±64 ^{a,b}	2011±186 ^b	0,007
Área Negativa (g.s)	-170±21 ^a	-207±8 ^a	-190±14 ^a	-202±18 ^a	0,083

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Através da análise da Tabela 9 pôde-se observar que, para a maioria dos parâmetros, as maionese com “farinhas de azeitona” apresentaram uma textura diferente da maionese controlo, salvo algumas exceções. A maionese com “farinha de azeitona verde” foi a única que se distinguiu em relação à firmeza (força positiva máxima) face ao controlo, sendo mais firme do que as restantes. A maionese controlo, em conjunto com a maionese com “farinha de azeitona mista”, apresentaram a menor coesividade (menores forças negativas máximas) e menor consistência (menores áreas positivas). Já em relação ao índice de viscosidade (área negativa), não foram observadas diferenças significativas entre as maionese.

4.2.3 Viscosidade

Além da textura avaliada na secção anterior, também se procedeu à avaliação da viscosidade das diferentes maionese. Na Figura 11 encontram-se representadas as curvas da viscosidade em função da velocidade de rotação, avaliada em rpm.

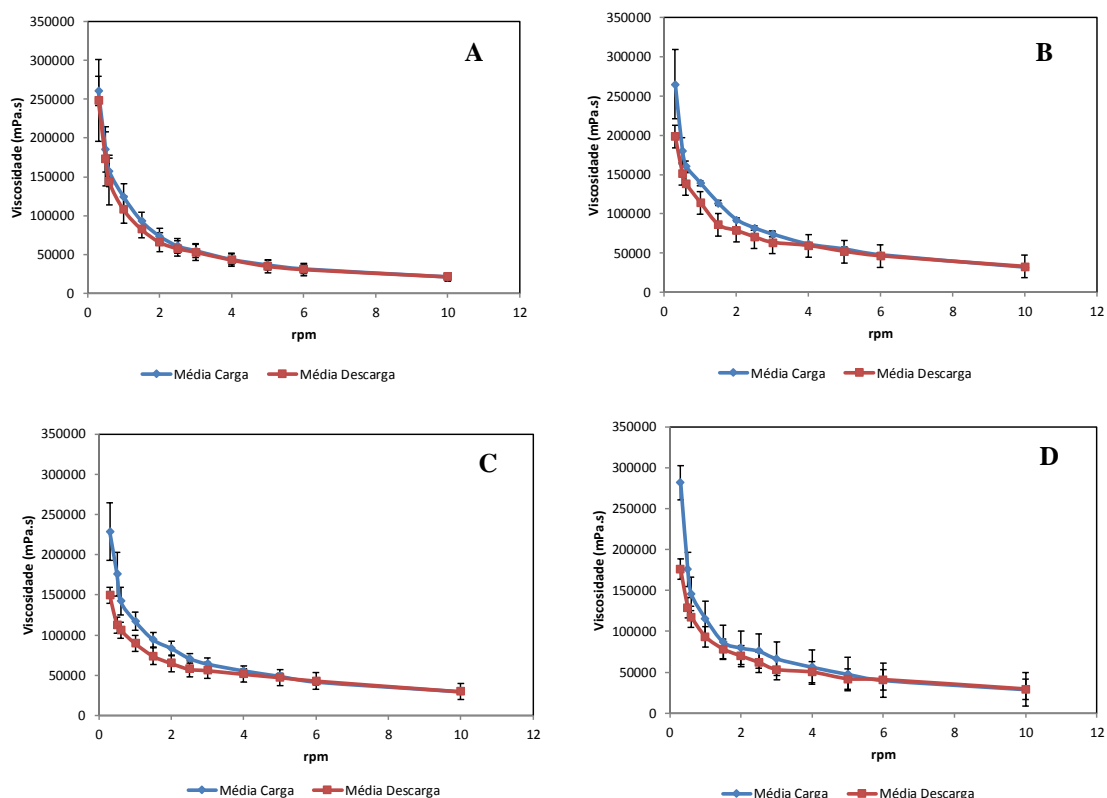


Figura 11: Valores da viscosidade (mPa.s) em função da velocidade de rotação (rpm) para as maionese: (A) Controlo; (B) Com “Farinha de Azeitona Verde”; (C) Com “Farinha de Azeitona Mista”; e (D) Com “Farinha de Azeitona Preta”.

Após análise da figura, constatou-se que todas as maioneses mostraram um comportamento semelhante. No entanto, não apresentaram um comportamento de um fluido Newtoniano, uma vez que a viscosidade não se manteve constante com a velocidade de rotação. Pelo contrário, a viscosidade diminuiu, indicando um comportamento próximo de um fluido pseudoplástico. Contudo, observou-se em todas as situações, uma pequena histerese (diferença entre as curvas da carga e descarga), indicativa da existência de alguma dependência com o tempo. A menor histerese foi observada para a maionese controlo. Devido há existência da histerese, as maioneses apresentaram um comportamento mais próximo de um fluido tixotrópico.

Relativamente aos valores de viscosidade obtidos, observou-se que a maionese com “farinha de azeitona mista” apresentou menores viscosidades para as velocidades de rotação mais baixas, em comparação com as outras maioneses.

4.2.4. Atividade da água, pH e teores de humidade, gordura e cinzas

As maioneses elaboradas neste trabalho foram submetidas a diversas análises para determinar a sua composição nutricional (Tabela 10). Contudo, por razões técnicas, só foi possível determinar a atividade da água, o pH e os teores de humidade, gordura e cinzas para as diferentes maioneses.

Tabela 10: Valores de atividade da água, pH e teores de humidade, gordura e cinzas para as diferentes maioneses

	Maioneses				p-value
	Controlo	c/ Farinha de Azeitona Verde	c/ Farinha de Azeitona Mista	c/ Farinha de Azeitona Preta	
a_w	0,974±0,001 ^c	0,961±0,001 ^a	0,963±0,001 ^b	0,964±0,001 ^b	<0,001
pH	4,28±0,11 ^a	4,28±0,06 ^a	4,31±0,02 ^a	4,27±0,03 ^a	0,777
Humidade (%)	28,14±0,49 ^a	27,69±0,08 ^a	27,63±0,40 ^a	27,95±0,48 ^a	0,543
Gordura (% p.s.)	95,8±0,2 ^b	93,8±0,8 ^a	93,4±0,6 ^a	93,8±0,4 ^a	0,001
Cinzas (% p.s.)	0,38±0,04 ^a	1,05±0,12 ^b	1,00±0,03 ^b	0,99±0,01 ^b	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas (p< 0,05).

Relativamente à atividade de água das maioneses, os valores foram superiores a 0,96, mas inferiores a 0,98. Valores de atividade da água entre 0,93 e 0,98 inibe o crescimento de bactérias Gram negativas, que dão lugar às Gram positivas (*Bacillaceae*,

Lactobacillaceae, *Micrococaceae*) (Ordóñez *et al.*, 2005). Inibe-se ainda o crescimento de salmonelas, *Clostridium botulinum* e de outras bactérias patogénicas. Contudo, o maior perigo é constituído pelo crescimento de *Staphylococcus aureus* (Ordóñez *et al.*, 2005), sendo muito importante garantir as boas práticas de higiene pessoal e de fabrico aquando da elaboração destes produtos. Também poderá haver risco de produção de micotoxinas por parte de bolores (Ordóñez *et al.*, 2005). Ao comparar as maioneses entre si, verificou-se que as que continham “farinha de azeitona” apresentaram valores de a_w mais baixos em relação à maionese controlo. Conclui-se, assim, que a adição de “farinha de azeitona” diminui a a_w .

Em relação ao pH, este parâmetro físico-químico é igualmente importante para se determinar a estabilidade microbiológica das maioneses. Pôde-se constatar que os valores de pH variaram entre os 4,27 e os 4,31, não havendo diferenças significativas entre amostras. Assim sendo, constatou-se que a adição de “farinha de azeitona de mesa” não influenciou o pH das maioneses. Além disso, como o pH é inferior a 4,5 inibe-se a germinação de esporos de *Cl. botulinum* em condições de anaerobiose (Ordóñez *et al.*, 2005).

Relativamente ao teor de humidade, este rondou os 28%, não se tendo observado diferenças significativas entre as maioneses. Pelo contrário, no teor de gordura observou-se um decréscimo no valor médio de 96 para 93-94% (p.s.) com a adição de “farinha de azeitona”. Tendência oposta foi observada para o teor de cinzas, tendo o valor mais baixo sido determinado na maionese controlo (0,38%, p.s.), subindo para próximo de 1% (p.s.) com a adição da “farinha de azeitona”. Podemos assim concluir que a adição de “farinha de azeitona” aumentou consideravelmente a percentagem de cinzas nas maioneses. Este aumento foi possivelmente devido à presença de sal nas azeitonas utilizadas na elaboração das farinhas.

4.2.5 Caracterização da fração lipídica

4.2.5.1 Perfil de ácidos gordos

A composição em ácidos gordos obtida para as diferentes maioneses encontra-se descrita na Tabela 11. Pode-se observar que o composto maioritário encontrado nas maioneses foi o ácido linoleico (C18:2c), com percentagens compreendidas entre 53,6% (correspondente à maionese com adição de farinha preta) e os 56,0% (valor correspondente à maionese controlo). Este valor pode justificar o facto dos valores de

PUFA serem aqueles que apresentam maiores percentagens (54,0% para a maionese com adição de farinha preta e de 56,3% para a maionese controle).

De seguida, o composto maioritário foi o ácido oleico (C18:1c), com percentagens a variar entre 30,2 e 32,0%. Estas percentagens elevadas neste ácido gordo, justificam os valores de MUFA obtidos (30,9 a 32,7%), uma vez que, este composto é um ácido gordo monoinsaturado. Relativamente aos ácidos gordos saturados (SFA), estes têm valores compreendidos entre 10,8 e 11,2%, sendo os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) os que mais contribuem para essas percentagens.

Tabela 11: Perfil de ácidos gordos das maioneses controle e maioneses com adição de “farinha de azeitona verde, mista e preta”

Ácido gordo	Controlo	Maioneses			p-value
		c/ Farinha de Azeitona Verde	c/ Farinha de Azeitona Mista	c/ Farinha de Azeitona Preta	
C16:0	6,30±0,02 ^a	6,57±0,06 ^b	6,57±0,03 ^b	6,71±0,13 ^b	<0,001
C17:0	0,05±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,06±0,01 ^a	0,222
C18:0	3,06±0,01 ^a	3,14±0,03 ^b	3,14±0,04 ^b	3,16±0,02 ^b	0,005
C20:0	0,21±0,01 ^a	0,22±0,01 ^a	0,22±0,01 ^a	0,21±0,02 ^a	0,437
C22:0	0,67±0,01 ^b	0,66±0,01 ^{a,b}	0,64±0,01 ^a	0,64±0,01 ^a	0,013
C24:0	0,26±0,01 ^{a,b}	0,26±0,01 ^b	0,25±0,01 ^{a,b}	0,24±0,01 ^a	0,018
SFA	10,77±0,01^a	11,12±0,10^b	11,11±0,06^b	11,25±0,13^b	<0,001
C16:1	0,24±0,01 ^a	0,26±0,01 ^b	0,26±0,01 ^b	0,28±0,01 ^b	<0,001
C18:1c	30,25±0,01 ^a	31,41±0,10 ^b	31,54±0,12 ^b	32,01±0,48 ^b	<0,001
C20:1	0,33±0,01 ^a	0,34±0,01 ^a	0,32±0,01 ^a	0,32±0,01 ^a	0,048
MUFA	30,90±0,01^a	32,12±0,10^b	32,24±0,12^b	32,72±0,49^b	<0,001
C18:2c	56,03±0,15 ^b	54,26±0,18 ^a	54,18±0,18 ^a	53,62±0,57 ^a	<0,001
C18:3c	0,12±0,01 ^a	0,16±0,01 ^b	0,16±0,01 ^b	0,15±0,01 ^b	0,001
C22:2	0,03±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,06±0,01 ^c	0,07±0,01 ^{b,c}	0,001
PUFA	56,33±0,15^b	54,65±0,18^a	54,58±0,17^a	54,04±0,56^a	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas (p< 0,05).

Verificou-se ainda que as maioneses com “farinha de azeitona” apresentaram uma gordura com maiores percentagens em ácidos gordos saturados e monoinsaturados,

e menores percentagens em ácidos gordos polinsaturados, do que a gordura presente na maionese controlo.

4.2.5.2 Perfil em tocoferóis

Na Tabela 12 são apresentados os valores obtidos para os tocoferóis existentes na gordura extraída das maioneses.

Tabela 12: Teores em tocoferóis (mg/kg de gordura extraída) das maioneses

	Controlo	Maionese			<i>p-value</i>
		c/ farinha de azeitona verde	c/ farinha de azeitona mista	c/ farinha de azeitona preta	
α-tocoferol	753±31 ^b	543±97 ^a	542±88 ^a	561±110 ^{a,b}	0,003
β-tocoferol	ND	5,27±0,27 ^a	4,20±2,08 ^a	2,45±2,69 ^a	0,083
γ-tocoferol	ND	5,35±0,27 ^b	4,82±0,31 ^a	4,98±0,37 ^{a,b}	0,035
Total	753±31 ^b	554±98 ^a	551±90 ^a	569±108 ^{a,b}	0,004

ND – Não detetado.

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Através da Tabela 12 observou-se que o α -tocoferol foi o composto que se encontra em maiores concentrações nas maioneses. O valor mais elevado foi obtido na maionese controlo (753±31 mg/kg de gordura), tendo-se observado um comportamento idêntico no total dos tocoferóis.

Pode-se também constatar que na maionese controlo não se detetou o β - e γ -tocoferóis, o que podemos concluir que estes compostos só estão presentes na maionese, se estas tiverem “farinha de azeitona”. Relativamente ao β -tocoferol, não se detetaram diferenças significativas entre as maioneses. Em relação ao γ -tocoferol, os valores médios mais elevados foram determinados na maionese com “farinha de azeitona verde” (5,35 mg/kg de gordura), seguida da elaborada com “farinha de azeitona preta”, e, por fim, pela maionese com “farinha de azeitona verde”.

4.2.6 Atividade antioxidante e perfil fenólico das maioneses

Relativamente à determinação da capacidade redutora total, os resultados obtidos para as diferentes maioneses encontram-se representados na Figura 12.

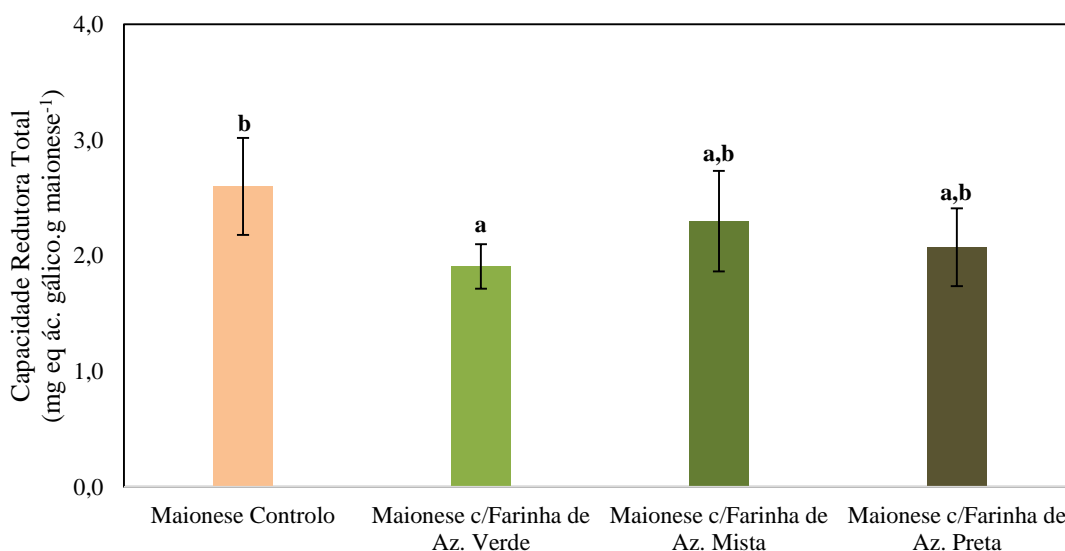


Figura 12: Capacidade redutora total das maioneses (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$))

Constatou-se que o controlo (maionese padrão sem adição de “farinha de azeitona”), foi aquela que apresentou a maior capacidade redutora total ($2,60 \pm 0,42$ mg eq ácido gálico/g maionese). Contudo, não se observaram diferenças significativas nas maioneses elaboradas com “farinha de azeitona mista e preta”. Pelo contrário, a maionese elaborada com “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou o valor mais baixo, em linha com o observado previamente com a farinha. No entanto, deve ser referido que, em simultâneo com as presentes amostras, analisaram-se três amostras de maioneses adquiridas em superfícies comerciais, tendo os valores obtidos (variaram entre 1,14 e 2,33 mg eq ácido gálico/g maionese) sido muito próximos aos detetados no presente trabalho.

No que respeita ao potencial antioxidante das maioneses com “farinhas de azeitona de mesa”, o mesmo foi avaliado pelo método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, cujos resultados podem ser observados na Figura 13.

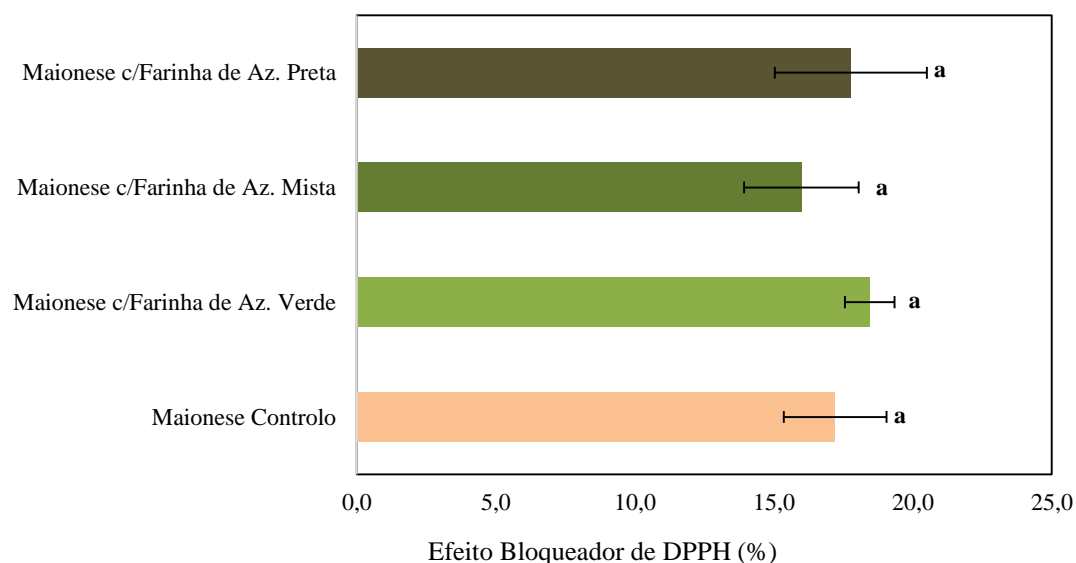


Figura 13: Percentagens de inibição obtidas para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH para as maioneses (letras diferentes entre amostras indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$))

As percentagens de inibição obtidas para o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH variaram entre 16,0 e 18,4%, não se observando diferenças significativas entre as maioneses. Assim, a adição de “farinha de azeitona” não afetou este parâmetro.

Os compostos fenólicos identificados nas maioneses encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Compostos fenólicos identificados nas maioneses (mg/kg de maionese).

Composto	Maionese c/Farinha de Azeitona Verde	Maionese c/Farinha de Azeitona Mista	Maionese c/Farinha de Azeitona Preta	<i>p-value</i>
Hidroxitirosol	139±9 ^c	91±5 ^b	51±2 ^a	<0,001
Tirosol	26,6±0,5 ^c	17,3±1,9 ^b	8,5±0,1 ^a	<0,001
Luteolina	7,0±0,7 ^b	3,9±0,1 ^a	3,9±0,5 ^a	<0,001
Total	172±10 ^c	112±3 ^b	63±1 ^a	<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

No que diz respeito à quantificação dos compostos fenólicos identificados nas maioneses verificou-se que foram detetados apenas três compostos, designadamente, hidroxitirosol, tirosol e luteolina. O hidroxitirosol foi o composto que se encontrou em maiores concentrações, tendo uma maior expressão na maionese com adição de “farinha de azeitona verde”. A luteolina foi o composto que se encontrou em menores quantidades,

sendo que na maionese com adição de “farinha de azeitona verde” a sua quantidade foi a mais alta, comparativamente com as restantes amostras.

Assim, pode-se concluir que estes três compostos são influenciados pelo grau de maturação das azeitonas, diminuindo ao longo da maturação do fruto. Ou seja, é possível encontrar maiores quantidades destes compostos nas maioneses com adição de “farinha de azeitona verde” e menores quantidades nas maioneses com “farinha de azeitona preta”. Estes resultados sugerem alguma degradação destes compostos ao longo da maturação da azeitona.

4.2.7 Parâmetros de qualidade

Nas maioneses determinaram-se os índices de peróxidos e avaliaram-se os coeficientes de extinção específicos (K_{232} , K_{268} e ΔK) para se verificar o grau de oxidação das maioneses. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores dos índices de peróxidos e coeficientes de extinção específicos determinados nas maioneses

Parâmetros Avaliados	Maioneses				<i>p-value</i>
	Controlo	c/ farinha de azeitona Verde	c/ farinha de azeitona Mista	c/ farinha de azeitona Preta	
Índice de Peróxidos (mEq.O₂/Kg)	7,47±0,01 ^b	7,19±0,49 ^{a,b}	6,65±0,01 ^a	7,19±0,49 ^{a,b}	<0,001
K₂₃₂	1,57±0,08 ^a	1,59±0,06 ^a	1,62±0,06 ^a	1,42±0,13 ^a	0,082
K₂₆₈	0,52±0,01 ^a	0,54±0,02 ^a	0,52±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a	0,078
ΔK	0,45±0,02 ^a	0,47±0,02 ^a	0,46±0,01 ^a	0,43±0,02 ^a	0,110

Letras diferentes na mesma linha indicam a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$).

Relativamente aos valores de peróxidos verificou-se que o valor mais elevado correspondeu à maionese controlo (7,47 mEq.O₂/Kg). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre esta amostra e as maioneses com “farinhas de azeitona verde e preta”. Pelo contrário, o valor mais baixo foi obtido na maionese com “farinha de azeitona mista”.

Relativamente aos valores dos coeficientes de extinção, não se observaram diferenças significativas entre as amostras, sugerindo que todas as maioneses apresentavam um grau de oxidação semelhante.

4.2.8 Análise sensorial

Realizou-se uma análise sensorial às maioneses com o intuito de averiguar por qual amostra recaia a preferência do consumidor e também numa perspetiva de saber se caso o produto fosse comercializado, se seria um produto aceite e com saída.

As amostras que foram disponibilizadas aos provadores foram quatro: amostra controlo, que consistiu na maionese padrão utilizada e à qual não foi adicionada “farinha de azeitona”; amostra de maionese com “farinha de azeitona verde”; amostra de maionese com “farinha de azeitona mista” e amostra de maionese com “farinha de azeitona preta”.

Nesta prova foram avaliados os seguintes parâmetros: cor, aparência, aroma, textura, paladar, doce, salgado, amargo e ácido. Na Figura 14 encontram-se representados os dados obtidos na análise sensorial.

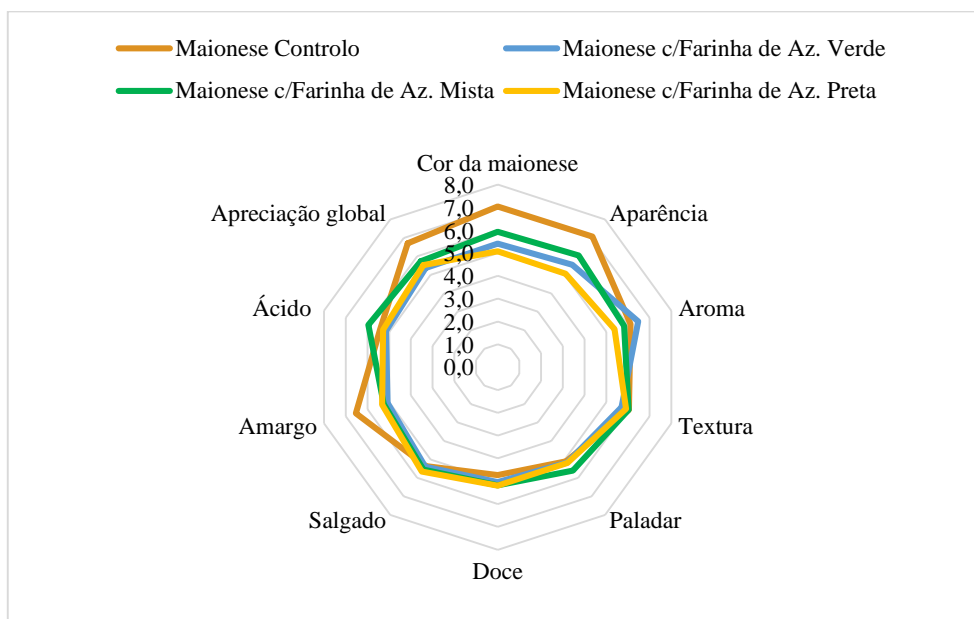


Figura 14: Resultados obtidos na análise sensorial efetuada às maioneses.

Observa-se na Figura 14, em relação aos parâmetros da cor e da aparência, que a maionese controlo foi aquela que obteve maior pontuação, ao contrário da maionese com “farinha de azeitona preta”. Esta preferência por parte dos consumidores pode ter

sido influenciada pela cor que a “farinha de azeitona preta” transferiu para a maionese, não sendo habitual ver uma maionese um pouco mais escura e com pigmentos violáceos, quase pretos. No parâmetro do aroma foi visível o destaque para a maionese com “farinha de azeitona verde”.

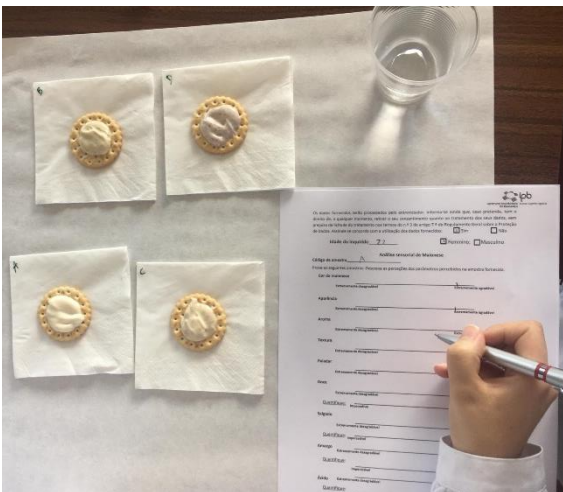
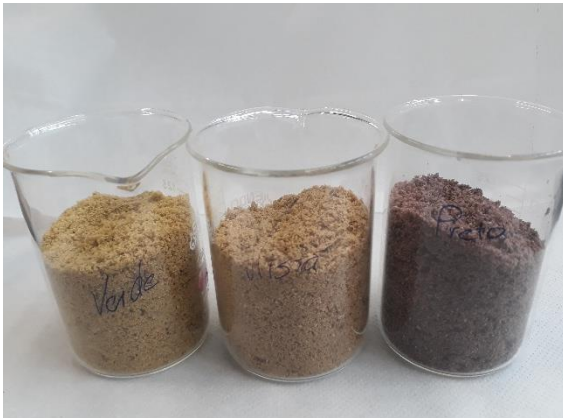
Relativamente à textura das maioneses, não se observou grande diferenciação entre as amostras por parte dos provadores. As diferenças anteriormente identificadas na análise com o texturômetro não foram detetadas ao nível sensorial. No entanto, a maionese com “farinha de azeitona mista” teve maior preferência no parâmetro do paladar, uma vez que as restantes maioneses não se diferenciaram entre si.

Nos restantes parâmetros, no que diz respeito ao doce e salgado, as quatro maioneses não mostraram, por parte dos provadores, diferenças significativas. Contudo, no parâmetro “amargo”, a maionese controlo destacou-se, enquanto no “ácido”, a maionese com “farinha de azeitona mista” foi a que demonstrou ter o sabor mais ácido.

Por fim, em termos de apreciação global, a maionese controlo foi a que obteve maior pontuação, seguida da maionese com “farinha de azeitona mista”. Já as maioneses com “farinhas de azeitona preta ou verde” foram as piores classificadas.

CAPÍTULO 5

Conclusão



5. Conclusão

No presente trabalho desenvolveram-se “farinhas de azeitona de mesa da cv. Cobrançosa”, com o intuito de valorizar esta cultivar e também de conferir maior valor ao produto final. Utilizaram-se azeitonas verdes, mistas e pretas de forma a elaborar três “farinhas” distintas. Com a utilização da liofilização pretendeu-se obter três “farinhas de azeitona” (verde, mista e preta) para que posteriormente fosse possível determinar qual a melhor farinha a ser selecionada para ser incorporada numa maionese, e também verificar se a “farinha de azeitona” conferia benefícios à mesma.

Tal como era esperado, as farinhas obtidas apresentaram cores distintas. Em relação à avaliação nutricional a “farinha da azeitona verde” apresentou o menor teor de gordura e valor energético em relação às outras duas farinhas. Contudo, apresentou maiores teores de proteína e hidratos de carbono em relação à “farinha da azeitona preta”. Em relação ao perfil em ácidos gordos, o ácido oleiro (C18:1) foi o maioritário, com percentagens compreendidas entre os 66,2 e os 71,9%. A “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou as maiores percentagens em relação ao ácido gordo mencionado e de MUFA. Pelo contrário, a “farinha de azeitona preta” foi a que demonstrou a maior percentagem em ácido palmítico (C16:0) e de SFA. Relativamente aos tocoferóis, a proporção foi sempre de α -tocoferol > γ -tocoferol > β -tocoferol. Na avaliação da atividade antioxidante verificou-se que a “farinha de azeitona preta” foi a que forneceu valores mais elevados de capacidade redutora total. No entanto, o mesmo não se verificou para o efeito bloqueador de radicais livres DPPH e ABTS^{•+}. Pelo contrário, nestes dois parâmetros, a “farinha de azeitona verde” foi aquela que originou maiores percentagens de inibição. Nas “farinhas de azeitona” foram identificados e quantificados nove compostos, tendo os maioritários sido o hidroxitirosol, tirosol e luteolina. Assim, foi possível elaborar “farinhas de azeitona” com diferentes propriedades.

Relativamente às maioneses com adição dessas “farinhas de azeitona” pôde novamente constatar-se a obtenção de produtos com cores distintas entre eles, e que as maioneses com “farinha de azeitona” apresentaram uma textura diferente da maionese controlo, salvo algumas exceções. Tal como era esperado, as maioneses não apresentaram comportamento Newtoniano, observando-se um comportamento tipo tixotrópico. A atividade da água nas maioneses foi superior a 0,96, mas inferior a 0,98, sendo o maior perigo constituído pelo crescimento do *St. aureus*. Contudo, a adição de “farinhas de azeitona” à maionese reduziu o teor de atividade de água, comparativamente à maionese

controle. Em relação ao pH, este foi inferior a 4,5, indicando a inibição da germinação de esporos de *Cl. botulinum*. Relativamente à composição nutricional, a adição de “farinha de azeitona” à maionese diminuiu o teor de gordura e aumentou o teor de cinzas. Em relação à fração lipídica, as maioneses com “farinhas de azeitona” apresentaram uma gordura com maiores percentagens de SFA e MUFA, e menores percentagens em PUFA, em relação à maionese controle. O α -tocoferol continuou a ser o composto maioritário. No entanto, foi a maionese controle a que apresentou os maiores valores em tocoferóis. Na avaliação da atividade antioxidante das maioneses pôde-se concluir que a maionese com “farinha de azeitona verde” foi a que apresentou menor capacidade redutora total, não se tendo observado diferenças significativas ao nível do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH. Relativamente à identificação e quantificação de compostos fenólicos nas maioneses, os três compostos detetados foram os mesmos que os maioritários identificados nas farinhas de azeitona de mesa, designadamente o hidroxitirosol, tirosol e luteolina. Verificou-se também que a maionese com “farinha de azeitona verde” continha as maiores quantidades destes compostos. Em relação aos parâmetros de qualidade, a maionese com “farinha de azeitona mista” foi a que forneceu o menor índice de peróxidos. Contudo, em relação à avaliação da oxidação lipídica pelos coeficientes de extinção no ultravioleta, os valores obtidos foram semelhantes entre as maioneses, não se detetando diferenças significativas entre elas. Relativamente à avaliação sensorial, e tendo em consideração a apreciação global, pôde-se constatar que a opção de compra dos provadores recaiu mais na maionese controle, seguida da maionese com “farinha de azeitona mista”. Deste modo, foi possível desenvolver maioneses com “farinhas de azeitona” com diferentes características.

Assim sendo, podemos concluir com este trabalho que maioneses com incorporação de “farinhas de azeitona de mesa da cv.Cobrançosa” podem ser um produto inovador, que permite valorizar ainda mais esta cultivar, indo de encontro a novos públicos e disponibilizando novos produtos de forma a dar resposta à procura crescente por parte dos consumidores que buscam produtos diferenciados. Este produto também pode ser uma mais-valia para a redução de desperdícios de matéria-prima da indústria de azeitona de mesa, uma vez que poderá ser uma forma de valorizar frutos de pequeno calibre ou com defeitos menores, que normalmente seriam rejeitados.

Referências

- Almeida, S. C. (2013). Contributo para a caracterização do processo produtivo e da composição fenólica de “Azeitonas de conserva Transmontanas”. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, pp.75.
- Alves, M. (2010). Produção industrial de azeitona verde no Algarve: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Tese de Mestrado. Universidade do Algarve, Faro, pp.107.
- Andrikopoulos, N. (2010). Estudios in vivo sobre actividad antioxidante y anticancerígena de las aceitunas de mesa. III Congreso Internacional de la Aceituna de mesa. Fundación para el Fomento y Promoción de la Aceituna de Mesa.
- Antunes, R. (2019). Desenvolvimento de “farinhas” a partir de azeitona de conserva “cv. Negrinha de Freixo”. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, pp.61.
- AOAC (2000), Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Ed.; Horwitz, W.; AOAC: Arlington, VA, Vol, II (1-3).
- Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D.L.; Oliver-Pozo, C.; Tena, N. e Morales, M.T. (2016). Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **118**, pp. 299-307.
- Aponte, M.; Venterino, V.; Blaiotta, G.; Volpe, G.; Farina, V.; Avellone, G.; Lanza, C.M. e Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, **27**, pp. 162-170.
- Arroyo-López, F.N.; Querol, A.; Bautista-Gallego, J. e Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, pp. 189–96.
- Avermaete, T.; Viaene, J. e Morgan, E. (2003). Determinants of innovation in small food firms. *European Journal of Innovation Management*, **6**, pp. 8-17.
- Bach-Faig, A., Berry, E.M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S. e Serra-Majem, L. (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, **14**, pp. 2274–2284.

- Barroso, T.F. (2014). Alimentos Enriquecidos com Vitaminas e Minerais. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, Lisboa, pp. 87.
- Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Barrio, E.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A.; e Arroyo-López, F.N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive 63 industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, **147**, pp. 89-96.
- Bayarçelik, E., Tasel, F., e Apak, S. (2014). A Research on Determining Innovation Factors for SMEs. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, **150**, pp. 202-211.
- Ben Othman, N.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, P. e Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, pp. 662-669.
- Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N. e Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, pp. 971-974.
- Blekas, G.; Vassilakis, C.; Harizanis, C.; Tsimidou, M. & Boskou, D.G. (2002). Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, pp. 3688-3692.
- Borges, A. (2013). Evolução da população microbiana ao longo do processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, pp. 88.
- Boulanouar, B.; Abdelaziz, G.; Aazza, S.; Gago, C. e Miguel, M.G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, **46**, pp. 85-96.
- Cabezas, J.M. (2011). La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Sevilla: Diputación de Sevilla, pp. 156.
- Charoenprasert, S. e Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, pp. 7081-7095.
- Codex Alimentarius (2010). Proposed Draft Codex Standard for Table Olives (Revision of Codex Stan 66-1981).

- COI - Conselho Oleícola Internacional (2004). Norma comercial aplicável às azeitonas de mesa. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Acedido a 25 de Outubro de 2019.
- Conde, C.; Delrot, S. e Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, **165**, pp. 1545-1562.
- Costa, A. e Jongen, W. (2006). New insights into consumer-led food product development. *Food Science & Technology*, **17**, pp. 457-465.
- DGADR – Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (2018). <https://www.dgadr.gov.pt/>. Acedido em 08 Novembro de 2019.
- Fernández, G.; Diéz, J. e Adams, R. (1997). *Table Olives: production and processing*. Chapman & Hall, pp.10-21.
- Fernandez-Orozco, R.; Roca, M.; Gandul-Rojas, B.; Gallardo-Guerrero, L. (2011). DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**, pp. 858-864.
- Fregapane, G. e Salvador, M.D. (2013). Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Research International*, **54**, pp. 1907-1914.
- Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N. e Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal Antimicrobial Agents*, **20**, pp. 293-296.
- Galanakis, C.M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, pp. 175-184.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K.M.; Gilani, A.H. e Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, pp. 3291-3340.
- Gómez, A.H.S.; Garcia, P.G. e Navarro, L.R. (2006). Trends in table olive production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, pp. 86-94.
- Gracia, A. e Albisu L.M. (2001). Food consumption in the European Union: Main determinants and country differences. *Agribusiness*, **17**, pp. 469-488.
- Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T. & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, pp. 2090-2097.

- Hurtado, A.; Reguant, C.; Esteve-Zarzoso, B.; Bordons, A. e Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Aberquina table olives. *Food Research International*, **41**, pp. 738–744.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, pp. 474.
- INE - Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2019). *Estatísticas Agrícolas*, pp. 171.
- Inês, C. (2015). *Variedades de olivo: caracterização de los primeiros estádios del desarrollo vegetativo y reproductivo*. Tesis doctoral - Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra, Universidad de Extremadura, Badajoz, pp. 140.
- ISO 9000:2015. *Sistemas de gestão da qualidade; Fundamentos e vocabulário*.
- ISO 9001:2000. *Sistemas de gestão da qualidade; Requisitos*.
- ISO 9936:2006. *Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography*. Switzerland: ISO 2006.
- Izidoro, D.R.; Scheer, A.P; Sierakowski, M. e Haminiuk, C. (2008). Influence of green banana pulp on the rheological behaviour and chemical characteristics of emulsions (mayonnaises). *LWT - Food Science and Technology*, **41**, pp.1018-1028.
- Kishk, Y.F.M e Elsheshetawy, H.E. (2013). Effect of ginger powder on the mayonnaise oxidative stability, rheological measurements, and sensory characteristics. *Annals of Agricultural Sciences*, **58**, pp. 213-220.
- Leitão, F.; Potes, M.; Calado, M. e Almeida, F. (1986) – *Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral de Planeamento e Agricultura, Lisboa, pp. 117.
- MacDonald-Wicks, L.K.; Wood, L.G. e Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, pp. 2046–2056.
- Mafra, I; Reis, A. e Coimbra, M. A. (2003). Efeito do processamento de azeitonas pretas oxidadas nos polissacarídeos das paredes celulares da polpa de azeitonas Douro. *6º Encontro de Química de Alimentos*, Lisboa, pp. 4.
- Malheiro, R.; Casal, S.; Sousa, A.; Pinho, P. G.; Peres, A.M.; Dias, L.G.; Bento; A. e Pereira, J.A. (2012). Effect of Cultivar on Sensory Characteristics, Chemical

- Composition, and Nutritional Value of Stoned Green Table Olives. *Food Bioprocess Technology*, **5**, pp. 1733-1742.
- Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A. e Pereira, J.A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, pp. 449-456.
- Malheiro, R.M.S. (2010). Influência da cultivar nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas de azeitonas verdes descaroçadas. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, pp. 120.
- Marsilio, V., Campestre, C., & Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, pp. 55–60.
- Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C.; Garcia, A. e Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, pp. 9817-9823.
- Menrad, K. (2004). Innovations in the food industry in Germany. *Research Policy*, **33**, pp. 845-878.
- Montaño, A.; Sánchez, A.H.; Casado, F.J.; Castro, A. e Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, **82**, pp. 297-302.
- Nogueira, F. (2012). Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspetos morfológicos, químicos e microbiológicos. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, pp. 98.
- Norma Portuguesa (NP) 3034:2012, Azeitonas de mesa: definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Norma Portuguesa (NP) 4456:2007, Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI). Terminologia e definições das actividades de IDI.
- Norma Portuguesa (NP) 4457:2007, Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI). Requisitos do sistema de gestão da IDI.
- Norma Portuguesa (NP) 4458:2007, Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI). Requisitos de um projecto de IDI.
- NP EN ISO 14001:2004, Sistemas de gestão ambiental; Requisitos e linhas de orientação para a sua utilização.
- NP EN ISO 14001:2015, Sistemas de gestão ambiental; Requisitos e linhas de orientação para a sua utilização.

- OCDE e FINEP (2005). Manual de Oslo. (3.ed.). Acedido em 12 de Setembro de 2019.
- Ordóñez, J.A.; Rodríguez, M.I.C.; Álvarez, L.F.; Sanz, M.L.G.; Minguillón, G.D.G.F.; Perales, L.H. e Cortecero, M.D.S. (2005). Tecnologia de Alimentos, Vol. 1, Componentes os Alimentos e Processos. Juan A. Ordóñez Pereda (Ed.), Artmed Editora, Brasil, pp. 294.
- Owen, R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B. e Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, pp.703-717
- Panagou, E.Z. e Katsaboxakis, C.Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish method. *Food Microbiology*, **23**, pp. 199-204.
- Parinos, C.S.; Stalikas, C.D.; Giannopoulos, T.S. e Pilidos, G.A. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, **145**, pp. 339-343.
- Pereira, J.A.; Pereira, A.P.G.; Ferreira, I.C.F.R.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Seabra, R.; Estevinho, L. e Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, pp. 8425–8431.
- Peres, A.M.; Baptista, P.; Malheiro, R.; Dias, L.G.; Bento, A. e Pereira, J.A. (2011). Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **105**, pp. 65-73.
- PubChem (2020). National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acedido a 17 de Outubro 2020.
- Raikos, V.; McDonagh, A.; Ranawana, V. e Duthie, G. (2016). Processed beetroot (*Beta vulgaris* L.) as a natural antioxidant in mayonnaise: Effects on physical stability, texture and sensory attributes. *Food Science and Human Wellness*, **5**, pp. 191-198.
- 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**, pp. 1231-1237.

- Regulamento (CEE) 2568/91. (1991, Julho 11). Relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, pp. 1.
- Regulamento Delegado (UE) 2015/1830. (2015, Julho 8). Alteração do Regulamento N° 2568/91 CEE relativo às características do azeite e do óleo de bagaço de azeitona e aos métodos de análise relevantes. Official Journal of the European Union(L266), pp. 9-13.
- Reis, J.P (2013). Desenvolvimento de Novas Formulações de Maionese Tradicional, Light e Fat-Free. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp. 84.
- Rejano, L.; Montañó, A.; Casado, F.J.; Sánchez, A.H. e Castro, A. (2010). Chapter 1 - Table Olives: Varieties and Variations. *In* Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention Academic Press, pp. 5-15.
- Rodrigues, J.A. (2011b). Determinação da atividade antioxidante e composição fenólica de vinhos Portugueses e correlação com parâmetros de cor. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar – Qualidade Alimentar, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp. 143.
- Rodrigues, N. (2011a). Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve. Tese de Mestrado. Universidade do Algarve, Faro, pp. 95.
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J.L. e Fernández-Bolaños, J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT. Food Science and Technology*, **42**, pp. 483-490.
- Rodríguez-Gómez, F.; Bautista-Gallego, J.; Romero-Gil, V.; Arroyo-López, F.N.; Garrido-Fernández, A. e García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, **46**, pp.56-63.
- Romero, C.; Brenes, M.; Garcia, P.; Garcia, A.& Garrido, A.(2004).Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, pp. 1973-1979.
- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K. e Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.. *Scientia Horticulturae*, **92**, pp. 147-176.

- Salgado, J.M.; Carrer, J.C. e Danielli, F. (2006). Sensory evaluation of traditional mayonnaise and enriched mayonnaise with aromatic herbs. *Food Science and Technology*, **26**, pp. 731-734.
- Saúde, C. (2014). Azeitona de mesa natural da cultivar Maçanilha com baixo teor de cloreto de sódio. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve, Algarve, pp. 84.
- Savarese, M.; Marco, E. e Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* Cv. Pisciotтана) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, pp. 761-770.
- SIAZ (s/d) - Sistema de Informação do Azeite e Azeitona de Mesa (2017/2018). <http://www.gpp.pt/index.php/estatisticas-e-analises/siaz-sistema-de-informacao-sobre-o-azeite-e-a-zeitona-de-mesa-2>. Acedido a 17 de outubro de 2019.
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Coelho, A.V. e Boas, L.V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, **12**, pp. 385–396.
- Singleton, V.L. e Rossi, J.A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, pp. 144-158.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J.C. e Wichers, H.J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp. 1013-1023.
- Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Malheiro, R.; Beatriz, M.; Oliveira, P.P. e Pereira, J.A. (2011). Chemical Characterization of “Alcaparras” Stoned Table Olives from Northeast Portugal. *Molecules*, **16**, pp. 9025-9040.
- Sousa, A.; Ferreira, I.C.F.R.; Calhelha, R.C.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. e Pereira, J. A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, pp. 8533-8538.
- Tunnicliffe, J.M.; Cowan, T.; Shearer, J. (2015). Chapter 86 – Chlorogenic acid in whole body and tissue-specific glucose regulation. In “*Coffee in Health and Disease Prevention*”, Victor R. Preedy (Ed.), pp. 777-785, Academic Press.
- Ünal, K.; & Nergiz, C. (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, **54**, pp. 71-76.

Vitaglione,P.; Savarese, M.; Paduano, A.; Scalfi, L.; Fogliano, V. e Sacchi, R. (2015)
Healthy virgin olive oil: A matter of bitterness. Critical reviews. Food Science
and Nutrition, **55**, pp. 1808-1818.