

Teor em Antioxidantes de Azeites Extra Virgens Monovarietais Portugueses

Alfredo Manuel Monteiro Esteves
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Bioquímica

2019



Teor em Antioxidantes de Azeites Extra Virgens Monovarietais Portugueses

Alfredo Manuel Monteiro Esteves

Mestrado em Bioquímica

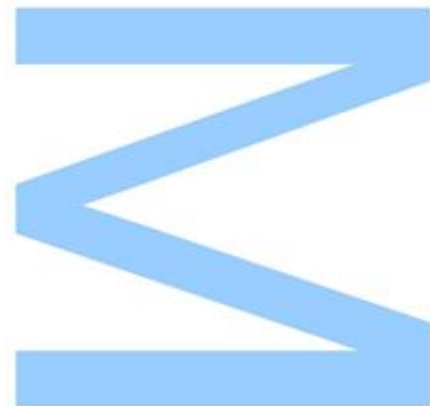
Departamento de Química e Bioquímica
2019

Orientador

Maria de Fátima Paiva Martins, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Coorientador

João Andrade, Engenheiro Agrónomo, Acushla, S.A.



U.PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

U.PORTO

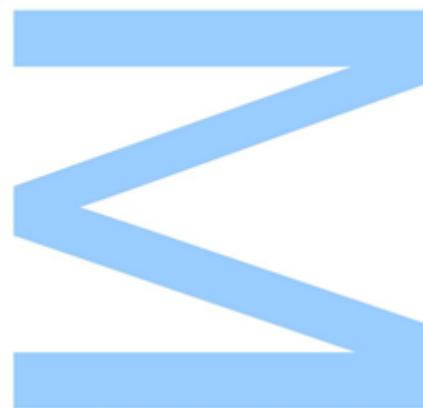


FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

O segredo para alcançar um bom resultado num desafio como o da envergadura de uma dissertação de mestrado não se resume apenas ao trabalho individual desenvolvido, mas também a toda uma equipa composta por pessoas e entidades que nos apoiam e incentivam dia após dia. Nesse seguimento, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos os que tornaram este trabalho possível:

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Maria de Fátima Paiva Martins pela dedicada forma como orientou todo este trabalho, dando-me a oportunidade, logo desde o início, de fazer parte de um novo projeto, contactando com novas técnicas e equipamentos. Sem ela, nenhum deste resultado seria possível. O meu sincero agradecimento por, em cada conselho ou conversa, me ensinar a “fazer ciência”.

Ao Engenheiro João Andrade, a oportunidade de ficar a conhecer um pouco mais de perto os segredos por detrás deste produto, bem como a oportunidade em conhecer a enorme exploração oleícola desta marca. Um sentido agradecimento pela gentileza em disponibilizar amostras de azeite da sua exploração.

Agradeço igualmente à Herdade do Esporão pelas amostras de azeite monovarietal gentilmente cedidas e que foram parte fulcral neste trabalho científico.

À Doutora Marlene Costa por todas as simpáticas dicas ao longo deste ano. Obrigado por estar presente sempre com uma mão amiga e com a sua experiência quando todo o trabalho parecia perdido.

À Catarina Ribeiro pelas gargalhadas e por todos os momentos que nunca esquecerei, desde o primeiro dia. Obrigado por toda a ajuda, troca de conhecimento e ânimo dado.

À Ana Raquel Duarte, à Rafaela Lopes e ao Tiago Ribeiro pela magnífica equipa que formamos dentro daquele laboratório.

À técnica Mafalda Flores pela indispensável ajuda nas análises dos FAMES e por me ajudar a conhecer um pouco melhor a técnica de GC-FID.

À minha família, meus pais e minhas tias, que nunca me deixaram esmorecer e sempre souberam dar a energia necessária para concluir este meu desejo. Estivessem perto ou em qualquer outro lado, foi a força deles o remo principal desta viagem.

A todos os meus amigos pelas pausas nos dias mais complicados, pelas animadoras conversas, pelas palavras de ânimo. De todos eles, não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a um dos companheiros de luta que mais esteve

presente em todos estes anos de academia: o meu sincero obrigado ao meu amigo, habitante de uma mesma casa e quase irmão Arlindo P. Fortes.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PHENOLIVA (PTDC/OCE-ETA/32492/2017 – POCI-01-0145-FEDER-032492).

Ao Rede de Química e Tecnologia – Laboratório de Química Verde (REQUIMTE-LAQV), à Universidade do Porto, em particular ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, pela oportunidade cedida em me deixarem trabalhar nos seus laboratórios e demais instalações.

Resumo

O azeite, a gordura vegetal mais importante na dieta mediterrânica, tem sido largamente estudado nos últimos anos no que toca às suas características químicas e nutricionais bem como aos seus benefícios para a saúde, tendo sido encontrada uma relação entre o consumo deste produto e a baixa incidência em doenças cardio e neurovasculares. Por esse motivo, tem-se levado a cabo investigação em torno do potencial papel dos compostos fenólicos presentes no azeite na prevenção deste tipo de patologias.

De modo a caracterizar pela primeira vez azeites monovarietais portugueses em termos da sua composição em compostos fenólicos, procedeu-se à análise de azeites extra virgens monovarietais de seis variedades (Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Madural e Verdeal) provenientes de Reguengos de Monsaraz (Herdade do Esporão) e de Vila Flor (Acushla, S.A.), com diferentes estados de maturação. Os azeites encontravam-se embalados e prontos para comercialização. Determinaram-se então as concentrações de fenóis, totais e individuais, e de α -tocoferol e γ -tocoferol. Avaliou-se ainda o nível de oxidação e a acidez, de modo a analisar o bom estado desses azeites. Efetuou-se igualmente o estudo do perfil em ácidos gordos.

Os azeites analisados apresentaram um teor médio de α -tocoferol de 537 ± 73 ppm e um teor médio de γ -tocoferol de $22,5 \pm 4,5$ ppm, não havendo grandes variações entre os azeites monovarietais de diferentes variedades. Os compostos fenólicos foram extraídos por dois métodos distintos (extração por fase sólida e extração líquido-líquido) apresentando valores de concentração de fenóis totais entre $325,95 \pm 16,40$ mg kg⁻¹ e $751,61 \pm 53,72$ mg kg⁻¹. A maior parte dos azeites analisados, contudo, apresentou valores em fenóis totais acima dos 350 ppm dependendo da variedade e índice de maturação. Tendo em conta o mesmo índice de maturação, os azeites monovarietais de Verdeal apresentaram um maior conteúdo em fenóis (751 ppm), seguidos dos azeites monovarietais de Madural, Cobrançosa e Cordovil, com cerca de 590 ppm. O azeite monovarietal que apresentou menor conteúdo foi o da Carrasquenha apenas com 265 ppm. Verificou-se que as amostras eram, no geral, ricas em secoiridóides, lignanos e com baixos conteúdos em álcoois fenólicos. No entanto, os azeites monovarietais de Verdeal e Madural foram os que apresentaram os maiores conteúdos em secoiridóides. O conteúdo em fenóis dos azeites monovarietais obtidos de azeitona com diferentes estados apenas diminuiu nos azeites obtidos da variedade Galega, mas manteve-se mais ou menos estável para as restantes variedades. De referir que todos os azeites

analisados evidenciaram características químicas de azeites virgem extra de elevada qualidade.

Dada a grande importância dos compostos fenólicos para a estabilidade, características organolépticas e qualidade nutricional dos azeites produzidos, espera-se que o conhecimento do conteúdo em antioxidantes dos vários azeites monovarietais venha a ser utilizado na seleção das variedades a utilizar na manutenção e cultivo de novos olivais, com vista à produção de azeites de elevada qualidade com a possível rotulagem contendo a alegação de saúde.

Quanto à composição em ácidos gordos, todos os azeites apresentaram um elevado conteúdo em ácido oleico (C18:1), com um valor médio de 74,7%, e percentagem em ácido linoleico entre 2,5 e 11,3%. Não se encontrou qualquer correlação entre a percentagem em ácido linoleico e o conteúdo em fenóis.

Em relação ao nível de oxidação e à acidez, os azeites apresentaram valores muito abaixo dos limites estipulados por lei (1% e 20 mEq O₂ kg⁻¹, respetivamente). A acidez determinada na maior parte dos casos não ultrapassou os 0,2%, e o índice de peróxidos encontrou-se entre 5 e 7,5 mEq O₂ kg⁻¹. Apenas a variedade Galega apresentou valores de acidez superiores, atingindo os 0,4%.

Palavras-Chave: azeite extra virgem; azeite monovarietal português; antioxidantes; polifenóis; ácidos gordos; tocoferol; UPLC.

Abstract

The olive oil, the most important vegetal fat in mediterranean diet, has been widely studied in the last years, regarding their chemical and nutritional characteristics as well as their benefits for health, having been found searching a relation between this product consumption and the low incidence in cardio and neurovascular disease. For this reason, an investigation has been carried out around the potential role of phenolic compounds present in olive oil in prevention of this type of pathology.

To characterize, for the first time, portuguese monocultivar extra virgin olive oil in terms of their composition in phenolic compounds, it was done the analyse to six different cultivars of monocultivar extra virgin olive oil (Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Madural and Verdeal) from Reguengos de Monsaraz (Herdade do Esporão) and Vila Flor (Acushla, S.A.), with different maturity states. The olive oils were packaged and ready for sale. It were then determined the concentration of total and individual phenols and α -tocopherol and γ -tocopherol. It also was evaluated the oxidation level and acidity, to analyse the good state of these olive oils. The fatty acid profile of these olive oils was also studied.

The analysed olive oils showed a medium content of α -tocopherol of 537 ± 73 ppm and a medium content of γ -tocopherol of 22.5 ± 4.5 ppm, not having large variations between monocultivar olive oils from different cultivars. The phenolic compounds were extracted by two different methods (phase-solid extraction and liquid-liquid extraction) showing phenolic compounds concentration values between 325.95 ± 16.40 mg kg⁻¹ and 751.61 ± 53.72 mg kg⁻¹. Most of the analysed olive oils, however, showed values in total phenols above 350 ppm depending on the variety and index of maturation. Considering the same maturity index, Verdeal monocultivar olive oils had a higher phenol content (751 ppm), followed by Madural, Cobrançosa and Cordovil monocultivar olive oils of about 590 ppm. The monocultivar olive oil with the lowest content was Carrasquenha with only 265 ppm.

It was verified that the samples phenolic profiles were rich in secoiridoids and lignans and with low contents of phenolic alcohols. However, the Verdeal and Madural monocultivar olive oils were the ones that presented the highest contents of secoiridoids. The phenol content of monocultivar olive oils obtained from olives of different states only decreased in olive oils obtained from the Galega variety, but remains more or less stable for the other varieties. It should be noted that all oils analyzed showed chemical characteristics of high quality extra virgin olive oils.

Given the great importance of phenolic compounds for the stability, organoleptic characteristics and nutritional quality of olive oils produced, it is expected that knowledge of the antioxidant content of various monocultivar olive oils will be used in the selection of varieties to be used for the maintenance and cultivation of new olive oils groves for the production of high quality olive oils with the possible health claim labeling. Regarding the fatty acid composition, all olive oils presented a high content of oleic acid (C18:1), with an average value of 74.7%, and a percentage of linoleic acid between 2.5 and 11.3%. No correlation was found between the percentage in linoleic acid and the content in phenols.

Regarding oxidation level and acidity, the olive oils presented values well below the limits stipulated by law (1% and 20 mEq O₂ kg⁻¹, respectively). The acidity determined in most cases did not exceed 0,2%, and the peroxide index was between 5 and 7.5 mEq O₂ kg⁻¹. Only the Galega variety presented higher acidity values, reaching 0.4%.

Key-words: extra virgin olive oil; portuguese monocultivar olive oil; antioxidants; polyphenols; fatty acids; tocopherol; UPLC.

Índice

I.	Introdução.....	1
1.	A Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).....	3
2.	O Fruto.....	6
3.	O Azeite	8
3.1.	Produção de Azeite	11
3.2.	Fatores que Influenciam a Qualidade do Azeite	12
3.3.	Composição Química do Azeite	13
3.3.1.	Triacilgliceróis/Triglicéridos	14
3.3.2.	Pigmentos.....	15
3.3.3.	Compostos Fenólicos.....	16
3.3.3.1.	Tocoferóis	17
3.3.3.2.	Álcoois Fenólicos	18
3.3.3.3.	Ácidos Fenólicos	19
3.3.3.4.	Flavonoides.....	19
3.3.3.5.	Lignanos.....	20
3.3.3.6.	Secoiridóides.....	21
3.4.	Alegação de saúde.....	23
4.	Oxidação Lipídica.....	26
4.1.	Auto-oxidação	26
4.2.	Foto-oxidação	27
5.	Antioxidantes.....	29
II.	Objetivos.....	31
III.	Material e Métodos	35
1.	Materiais	37
1.1.	Obtenção e descrição das amostras de azeite	38

1.2.	Compostos Fenólicos.....	39
1.2.1.	Extrações de oleuropeína de folhas de <i>Olea europaea</i> L.....	39
1.2.2.	Extração de 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA de folhas de <i>Olea europaea</i> L.....	41
1.3.	Análises preliminares efetuadas aos azeites.....	43
1.3.1.	Índice de Acidez.....	43
1.3.2.	Índice de Peróxidos.....	43
1.4.	Determinação dos compostos fenólicos nos azeites	44
1.4.1.	Obtenção dos fenóis por extração em fase sólida (SPE).....	44
1.4.2.	Obtenção dos fenóis por extração líquido-líquido (Método COI/T.20/Doc No 29/Rev.1 2017) ⁶⁷	45
1.4.3.	Determinação de compostos fenólicos presentes nos extratos por UHPLC	45
1.5.	Determinação de α -tocoferol e de γ -tocoferol presentes no azeite por UHPLC ⁶⁸	46
1.5.1.	Validação do Método	47
1.6.	Determinação da Composição em Ácidos Gordos do Azeite.....	48
IV.	Resultados e Discussão	49
1.	Análises preliminares efetuadas aos azeites.....	51
1.1.	Índice de Acidez.....	51
1.2.	Índice de Peróxidos.....	53
2.3.	Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite extraídos por Extração Líquido-Líquido (Método COI/T.20/Doc No 29/Rev.1 2017).....	58
2.3.1.	Determinação dos compostos fenólicos totais presentes no azeite	58
2.3.2.	Determinação dos compostos fenólicos individuais presentes no azeite	63
2.4.	Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite extraídos por Extração por Fase Sólida (SPE)	65
2.4.1.	Determinação dos compostos fenólicos totais presentes no azeite	65

2.4.2. Determinação dos compostos fenólicos individuais presentes no azeite	67
3. Determinação de α -Tocoferol e de γ -Tocoferol presentes no azeite.....	69
4. Determinação da Composição em Ácidos Gordos	73
V. Conclusões.....	77
Conclusões e perspetivas futuras.....	79
VI. Referências Bibliográficas	83
VII. Anexos	91
Anexo I – Análises preliminares efetuadas aos azeites Índice de Acidez	93
Anexo II – Análises preliminares efetuadas aos azeites Índice de Peróxidos	96
Anexo III – Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite Obtenção das retas de calibração	99
Anexo IV – Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite Compostos fenólicos individuais e totais presentes no azeite extraídos por Extração Líquido-Líquido e por Extração por Fase Sólida.....	105
Anexo V – Determinação de α -tocoferol e γ -tocoferol presentes no azeite Obtenção das retas de calibração	109
Anexo VI – Determinação de α -tocoferol e γ -tocoferol presentes no azeite.....	111
Anexo VII – Determinação da Composição em Ácidos Gordos	114

Índice de Figuras

Figura 1 - Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.).....	3
Figura 2 – Distribuição das plantações de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.) e dos azeites de Denominação de Origem Protegida (DOP) em Portugal.	5
Figura 3 – Esquema representativo da composição física da azeitona.	6
Figura 4 – Estrutura química de um Triacilglicerol (TAG).	14
Figura 5 - Ácido Oleico (ácido octadec-9-enóico) (C18:1) (isómero cis), reportado como o mais abundante em azeite virgem extra.....	14
Figura 6 - Estrutura química de um Tocoferol.	17
Figura 7 - Estrutura química dos Álcóois Fenólicos e derivado: hidroxitirosol (A); tirosol (B); acetato de hidroxitirosol (C).....	18
Figura 8 - Estrutura química de Ácidos Benzoicos.	19
Figura 9 - Estrutura química de Ácidos Cinâmicos.	19
Figura 10 - Estrutura química de um Flavonoide.....	20
Figura 11 - Estrutura química dos Lignanós.	20
Figura 12 - Estrutura química da Oleuropeína (A) e seu Ligstrósido (B).....	21
Figura 13 - Estrutura química dos Secoiridóides: 3,4-DHPEA-EDA (A); 3,4-DHPEA-EA (B); <i>p</i> -HPEA-EDA (C); <i>p</i> -HPEA-EA (D).	22
Figura 14 - Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis..	26
Figura 15 - Estabilização do radical fenóxilo por deslocalização eletrónica.....	30
Figura 16 - Mecanismo de atuação dos antioxidantes catecólicos.	30
Figura 17 - Reação de formação de FAMES por transesterificação dos ácidos gordos.	48
Figura 18 - Valor de acidez das amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.	51
Figura 19 - Índice de peróxidos das amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.	53
Figura 20 - Área do pico em função da concentração de HyTy e respetiva regressão linear.....	55
Figura 21 - Área do pico em função da concentração de Ty e respetiva regressão linear.	55
Figura 22 - Área do pico em função da concentração de HyTyAc e respetiva regressão linear.....	56

Figura 23 - Área do pico em função da concentração de Oleuropeína e respetiva regressão linear.	56
Figura 24 - Área do pico em função da concentração de 3,4-DHPEA-EDA e respetiva regressão linear.	57
Figura 25 - Área do pico em função da concentração de 3,4-DHPEA-EA e respetiva regressão linear.	57
Figura 26 - Cromatograma obtido por UHPLC com os respetivos picos do HyTy (A), Ty (B), Ácido Siríntrico (C) e HyTyAc (D).	58
Figura 27 - Cromatograma obtido por UHPLC com o respetivo pico da Oleuropeína (A).	58
Figura 28 - Cromatograma obtido por UHPLC com os respetivos picos do 3,4-DHPEA-EDA (A) e do 3,4-DHPEA-EA (B).	59
Figura 29 - Cromatograma obtido por UHPLC de um extrato fenólico obtido por extração líquido-líquido a partir de azeite extra virgem. Hidroxitirosol (A); Tirosol (B); Acetato de Hidroxitirosol (C); 3,4-DHPEA-EDA (D); Acetato de Tirosol (E); Oleocantal (F); Pinoresinol (G); Acetoxipinoresinol (H); 3,4-DHPEA-EA (I); <i>p</i> -HPEA-EA (J).	59
Figura 30 - Concentração de compostos fenólicos presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.	60
Figura 31 - Concentração de compostos fenólicos presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.	62
Figura 32 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (HyTy, Ty, HyTyAc, Py e PyAc) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM ₂). Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra.	63
Figura 33 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (Ty-EDA, TyAc, HyTy-EDA, Ol. + Ol. A., Ty-EA e HyTy-EA) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM ₂).	63
Figura 34 - Cromatograma obtido por UHPLC de um extrato fenólico obtido por extração por fase sólida a partir de azeite extra virgem. Hidroxitirosol (A); Tirosol (B); Acetato de Hidroxitirosol (C); 3,4-DHPEA-EDA (D); Acetato de Tirosol (E); Oleocantal (F); Pinoresinol (G); Acetoxipinoresinol (H); 3,4-DHPEA-EA (I); <i>p</i> -HPEA-EA (J).	65
Figura 35 - Concentração de compostos fenólicos presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação	66
Figura 36 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (HyTy, Ty, HyTyAc, Py e PyAc) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM ₂).	67

Figura 37 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (Ty-EDA, TyAc, HyTy-EDA, Ol. + Ol. A., Ty-EA e HyTy-EA) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM ₂).....	67
Figura 38 - Cromatograma obtido por UHPLC de amostra de azeite e respetivos pico do γ -tocoferol (A) e do α -tocoferol (B).	69
Figura 39 - Cromatograma obtido por UHPLC de uma solução padrão e respetivo pico de γ -tocoferol (A) e α -tocoferol (B).	69
Figura 40 - Área dos picos em função da concentração de α -tocoferol e respetiva regressão linear.	70
Figura 41 - Área dos picos em função da concentração de γ -tocoferol e respetiva regressão linear.	70
Figura 42 - Concentração de α -tocoferol presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.....	71
Figura 43 - Concentração de γ -tocoferol presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação.....	71
Figura 44 - Cromatograma obtido por GC-FID com os respetivos picos dos FAMES característicos do Ácido Butírico – C4:0 (A), Ácido Cáprico – C10:0 (B), Ácido Láurico – C12:0 (C), Ácido Mirístico – C14:0 (D), Ácido Palmítico – C16:0 (E), Ácido Esteárico – C18:0 (F), Ácido Oleico – C18:1 (G), Ácido Linoleico – C18:2 (H) e Ácido Linolénico – C18:3 (I).....	73
Figura 45 - Cromatograma obtido por GC-FID de uma amostra de FAMES de azeite extra virgem contendo Ácido Palmítico – C16:0 (A), Ácido Esteárico – C18:0 (B), Ácido Oleico – C18:1 (C), Ácido Linoleico – C18:2 (D) e Ácido Linolénico – C18:3 (E).....	74
Figura 46 - Perfil nos principais ácidos gordos (percentagem) em função da variedade. (ácido gordo: C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:3 – ácido linolénico.	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Taxonomia Clássica da Oliveira.....	4
Tabela 2 – Características dos azeites e sua composição acídica.	10
Tabela 3 - Características do azeite – valores percentuais permitidos por lei para os principais ácidos gordos encontrados.	15
Tabela 4 - Alegações de saúde e condições de uso autorizadas pela EFSA e presentes no Regulamento (UE) N.º. 432/2012 da Comissão Europeia de 16 de maio de 2012 relativas ao azeite e respetiva substância ao qual devem estas ser associadas.	23
Tabela 5 - Semanas de colheita das diferentes amostras e respetivo índice de maturação.....	39
Tabela 6 - Gradiente de eluentes utilizados para determinação de compostos fenólicos individuais por UHPLC.	46
Tabela 7 - Gradiente de eluentes utilizados para determinação de α -tocoferol por UHPLC.	47
Tabela 8 - Regressão linear da reta padrão do HyTy.	55
Tabela 9 - Regressão linear da reta padrão do Ty.....	55
Tabela 10 - Regressão linear da reta padrão do HyTyAc.	56
Tabela 11 - Regressão linear da reta padrão da Oleuropeína.	56
Tabela 12 - Regressão linear da reta padrão do 3,4-DHPEA-EDA.....	57
Tabela 13 - Regressão linear da reta padrão do 3,4-DHPEA-EA.....	57
Tabela 14 - Regressão linear da reta padrão do α -tocoferol.....	70
Tabela 15 - Regressão linear da reta padrão do γ -tocoferol.	70
Tabela 16 - Valores de acidez registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas em triplicado e respetiva média e desvio-padrão.	93
Tabela 17 – Índice de peróxidos registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas em triplicado e respetiva média e desvio-padrão.	96
Tabela 18 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de hidroxitirosol (HyTy) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.....	99
Tabela 19 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de tirosol (Ty) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	100
Tabela 20 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de oleuropeína (Ol.) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	101
Tabela 21 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de acetato de hidroxitirosol (HyTyAc) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.....	102

Tabela 22 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de 3,4-DHPEA-EDA e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	103
Tabela 23 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de 3,4-DHPEA-EA e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	104
Tabela 24 - Valores de concentração de fenóis individuais e fenóis totais extraídos por extração líquido-líquido.....	105
Tabela 25 - Valores de concentração de fenóis individuais e fenóis totais extraídos por extração por fase sólida (SPE).....	107
Tabela 26 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de α -tocoferol e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	109
Tabela 27 - Concentração da solução <i>stock</i> e das soluções padrão de γ -tocoferol e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.	110
Tabela 28 - Valores de concentração de α -tocoferol e γ -tocoferol registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas.	111
Tabela 29 - Valores percentuais dos principais ácidos gordos presentes nas amostras de azeite virgem extra analisadas (ácido palmítico – C16:0, ácido esteárico – C18:0, ácido oleico – C18:1, ácido linoleico – C18:2 e ácido linolénico – C18:3.....	114

Lista de Abreviaturas

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Protão

CAR – Carrasquenha (variedade de azeitona)

COB – Cobrançosa (variedade de azeitona)

COI – Conselho Oleícola Internacional

COR – Cordovil (variedade de azeitona)

DAD – Detetor UV-Vis de fotodíodos (*Diode-array Detector*)

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

FAMEs – Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos (*Fatty Acids Metyl Esters*)

GAL – Galega (variedade de azeitona)

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (*Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*)

HyTy ou **3,4-DHPEA** – Hidroxitirosol ou 2-(3,4-diidroxifenil)etanol – *Nome IUPAC: 4-(2-hidroxietil)benzeno-1,2-diol*

HyTyAc – Acetato de Hidroxitirosol – *Nome IUPAC: Etanoato de 2-(3,4-diidroxifenil)etilo*

HyTy-EA ou **3,4-DHPEA-EA** – isómero de oleuropeína aglicona – *Nome IUPAC: (4S,5Z,6R)-4-[2-[2-(3,4-diidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-hidroxi-4H-piran-3-carboxilato de metilo*

HyTy-EDA ou **3,4-DHPEA-EDA** – forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao 3,4-DHPEA – *Nome IUPAC: (4Z)-4-formil-3-(2-oxoetil)hex-4-enoato de 2-(3,4-diidroxifenil)etilo*

IM_x – Índice de Maturação

MAD – Madural (variedade de azeitona)

MUFA – Ácido Gordo Monoinsaturado (*Monounsaturated Fatty Acid*)

OI. – Oleuropeína – *Nome IUPAC: (4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-diidroxifenil)etoxi]-2-oxoetil]-5-etilideno-6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-4H-pirano-3-carboxilato de metilo*

OI. A. – Oleuropeína Aglicona

PUFA – Ácido Gordo Poliinsaturado (*Polyunsaturated Fatty Acid*)

Py – Pinosresinol – *Nome IUPAC: 4-[(3S,3aR,6S,6aR)-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrofuro[3,4-c]furan-3-il]-2-metoxifenol*

PyAc – Acetoxipinosresinol – *Nome IUPAC: Etanoato de [(3R,3aS,6S,6aR)-3,6-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4,6,6a-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]furan-3a-ilo]*

rpm – rotações por minuto

SFA – Ácido Gordo Saturado (*Saturated Fatty Acid*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid-Phase Extraction*)

TAG - Triacilglicerol

TLC – Cromatografia em Camada Fina (*Thin-Layer Chromatography*)

Ty ou **p-HPEA** – Tirosol ou (*p*-hidroxifenil)etanol – *Nome IUPAC: 4-(2-hidroxi)fenol*

Ty-EA ou **p-HPEA-EA** – isómero da oleuropeína aglicona – *Nome IUPAC: (Z)-3-etilideno-2-hidroxi-4-(2-(4-hidroxifenetoxi)-2-oxoetil)-3,4-dihidroxi-2-H-piran-5-carboxilato de metilo*

Ty-EDA ou **p-HPEA-EDA** – Oleocantal – forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao *p*-HPEA – *Nome IUPAC: (E)-4-formil-3-(2-oxoetil)hex-4-enoato de 2-(4-hidroxifenil)etilo*

UHPLC/UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

UV-Vis – Espectrofotometria de Luz Ultravioleta/Visível

VER – Verdeal (variedade de azeitona)

I. Introdução

1. A Oliveira (*Olea europaea* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.) (figura 1), uma das mais antigas espécies arbóreas cultivadas, encontra-se na Bacia Mediterrânica desde há cerca de 7000 anos.¹ A utilização na alimentação tanto do seu fruto, a azeitona, como do produto deste, o azeite, bem como a utilização do azeite como combustível, levou a que fosse o cultivo da oliveira rapidamente expandido pelo mundo, desde o seu ponto central de origem, a Síria, Israel, Líbano, Chipre e Creta.²



Figura 1 - Oliveira (*Olea europaea* L.)

Atualmente, encontra-se o cultivo desta espécie arbórea em países localizados principalmente em latitudes entre 30 e 45°, como é o caso dos da Bacia Mediterrânica, região conhecida pelo forte cultivo de oliveira e produção de azeite.²

Em termos botânicos, a oliveira ou *Olea europaea* L. pertence à família *Oleaceae*, de onde fazem parte outros géneros decorativos tal como o *Jasminum* L.. Recentemente, a oliveira foi ainda alocada a uma subfamília, a *Oleideae* e ao género *Olea* (tabela 1).²

Tabela 1 - Taxonomia Clássica da Oliveira. (adaptado de ²)

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Scrophulariales
Família	Oleaceae
Género	<i>Olea</i> L.
Espécie	<i>Olea europaea</i> L.
Subespécie	<i>Olea europaea</i> L. spp. <i>europaea</i>

Na Bacia Mediterrânica, a cultura da oliveira surge como a mais predominante³, ocupando aproximadamente 8 milhões de hectares, cerca de 98% do cultivo mundial desta espécie arbórea.⁴ Mundialmente, o seu cultivo tem vindo a aumentar dado o alto valor energético, nutricional, farmacêutico, bem como financeiro dos seus produtos finais (azeitona e azeite).^{3,5}

Dado o elevado interesse económico do olival, tem surgido um aumento na procura de novos métodos de produção para além dos já praticados tradicionalmente, com a introdução de olivais intensivos com alta (250 a 850 árvores ha⁻¹) e super alta (1500 a 3000 árvores ha⁻¹) densidade de plantio.⁶

A oliveira compreende atualmente cerca de 2500 variedades, das quais 250 são classificadas como comerciais pelo Conselho Oleícola Internacional (COI)^{1, 5} e encontram-se dispersas mundialmente por 54 países.⁷ Este elevado número de variedades pode ser explicado pela elevada capacidade de sobrevivência da árvore e pela manutenção das suas características genéticas, denotando-se apenas variações fenotípicas entre as diferentes variedades (tamanho, peso, forma e cor do fruto antes da sua maturação, resistência a doenças, bem como o tamanho das folhas e o rendimento em azeite).⁷

Em Portugal estão registadas 21 variedades de oliveira de origem nacional, estando geograficamente localizadas nas regiões interiores do país, com uma forte predominância nas regiões de Trás-os-Montes e do Alentejo.⁷ Trata-se de um país com parcelas de cultivo e produção tradicionalmente pequenas, havendo apenas registados sete tipos de azeite como Denominação de Origem Protegida (DOP) (figura 2).⁷

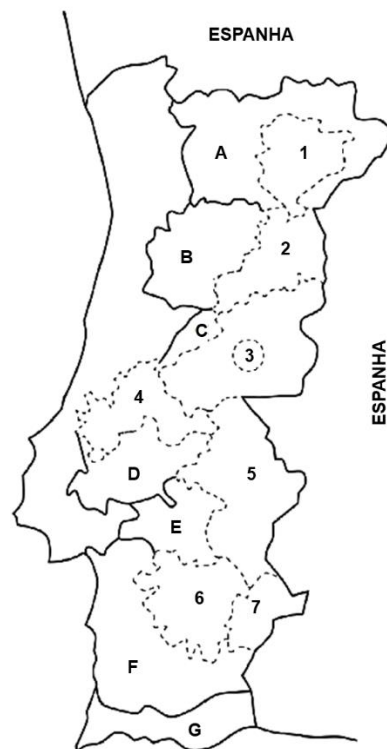


Figura 2 – Distribuição das plantações de oliveira (*Olea europaea* L.) e dos azeites de Denominação de Origem Protegida (DOP) em Portugal. As letras maiúsculas representam as províncias (rodeadas a linha completa) e os números referem-se à localização dos azeites DOP (rodeados a tracejado). A – Trás-os-Montes; B – Beira Alta; C – Beira Baixa; D – Ribatejo; E – Alto Alentejo; F – Baixo Alentejo; G – Algarve. 1 – Azeite de Trás-os-Montes; 2 – Azeite da Beira Alta; 3 – Azeite da Beira Baixa; 4 – Azeite do Ribatejo; 5 – Azeite do Norte Alentejano; 6 – Azeite do Alentejo Interior; 7 – Azeite de Moura. (adaptado de ⁷)

2. O Fruto

Nas plantações oleícolas da Europa, a oliveira floresce pela primavera, dando origem a um pequeno broto oval.^{2, 8} Por sua vez, este desenvolve-se até originar uma drupa madura entre outubro e janeiro, conforme a área geográfica.⁸

A azeitona é composta por duas partes principais: o pericarpo e o endocarpo (figura 3).²

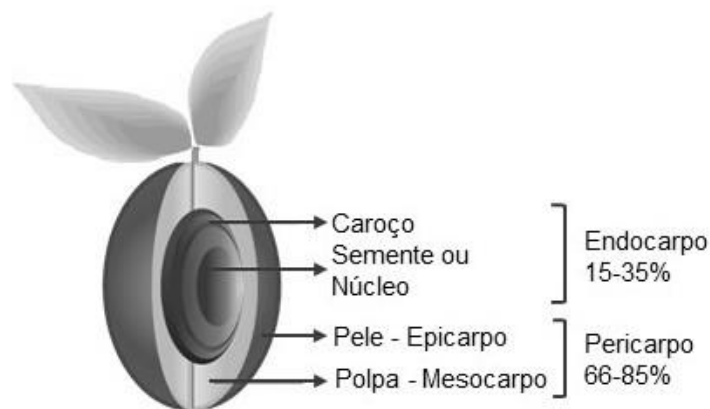


Figura 3 – Esquema representativo da composição física da azeitona. (adaptado de ²)

Por sua vez, o pericarpo é composto pelo epicarpo (pele) e pelo mesocarpo (polpa), representando 66 a 85% do peso do fruto.² A pele é coberta por uma cera natural e muda de cor ao longo do processo de maturação, desde uma tonalidade verde brilhante até tons acastanhados ou até mesmo negros.¹ O endocarpo (também conhecido como núcleo) é a parte que contém a semente, não excedendo normalmente 3% do peso do fruto.² A azeitona apresenta um tamanho típico de 2 a 3 cm e um peso entre os 2 e os 20 cm, dependendo da variedade.¹

O crescimento do fruto até à sua colheita poderá ter uma duração de 5 meses (em condições climatéricas normais), podendo haver um atraso em situações climáticas de frio.¹

Durante o crescimento e maturação do fruto, ocorrem várias modificações.⁸ Durante este processo, formam-se compostos fenólicos, sendo os mais abundantes no fruto os glicósidos ligstrósido e oleuropeína.⁸

Os glicósidos estão contidos no pericarpo, podendo ser desglicosilados por glucosidases, originando secoiridóides agliconas, mais lipofílicos e por isso encontrados em maior quantidade no azeite.⁸

A azeitona é constituída por água ($\approx 50\%$), óleo ($\approx 22\%$), carboidratos ($\approx 19,1\%$), dos quais a celulose ($\approx 5,8\%$), compostos fenólicos ($\approx 1-3\%$), proteína ($\approx 1,6\%$) e compostos inorgânicos ($\approx 1,5\%$), ocorrendo variações substanciais nestas proporções dependendo da variedade, do método de cultivo, da localização geográfica, bem como do índice de maturação do fruto.¹

3. O Azeite

O azeite é o óleo vegetal, obtido diretamente da azeitona unicamente por extração mecânica e consumido sem tratamento adicional.⁹ Para além da sua utilização na alimentação (em saladas, molhos e fritura), o azeite é ainda usado na indústria cosmética e farmacêutica.¹

Em termos nutricionais, segundo o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, uma porção de 100 g de azeite contém, a nível nutricional, cerca de 900 kcal, onde figuram 99,9 g de lípidos, 14 mg de vitamina E e 0,1 g de proteína.¹⁰

O azeite representa aproximadamente 4% da produção total de óleos alimentares, com uma produção mundial de 2000000 toneladas.^{11, 12} Os países da Bacia Mediterrânica destacam-se como os grandes produtores mundiais de azeite (70% da produção), com Espanha, Itália, Grécia, Turquia, Marrocos, Tunísia e Magreb a ocupar os primeiros lugares e Portugal a ocupar o atual nono lugar.^{11, 13, 14} No entanto, apesar do azeite ser um produto característico da dieta mediterrânica, outros países encontram-se a expandir a sua produção, nomeadamente os EUA, Austrália, Canadá e Japão.^{11, 13}

Dependendo da sua composição química e das características organoléticas, tais como a acidez, o azeite é classificado em diferentes tipos (*tabela 2*).^{11, 12, 15} Em Portugal, de acordo com a Norma Portuguesa Definitiva NP-972 (retificada posteriormente em 1988 pelo Decreto-Lei n.º 343/88 de 28 de setembro e em 2013 pelo Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro), os azeites comestíveis podem ter classificações diferentes de acordo com o seu processo de obtenção:¹⁵⁻¹⁷

- **Azeite virgem** – azeite obtido a partir da azeitona (fruto da oliveira) sem qualquer tipo de operação de refinação;
- **Azeite refinado** – azeite obtido do azeite virgem por qualquer tipo de operação de refinação.

No que diz respeito à sua comercialização, o azeite poderá ainda ser classificado de:^{16, 17}

- **Azeite virgem extra** – azeite virgem com caracteres organoléticos irrepreensíveis, cuja acidez, expressa em ácido oleico, seja igual ou inferior a 0,80%;

- **Azeite virgem** – azeite virgem com gosto irrepreensível, cuja acidez, expressa em ácido oleico, não seja superior a 2,00%;
- **Azeite lampante** – azeite virgem com gosto defeituoso ou cuja acidez, expressa em ácido oleico, seja superior a 2,00%;
- **Azeite refinado** – azeite obtido por refinação de azeite virgem cuja acidez, expressa em ácido oleico, não seja superior a 0,30%;
- **Azeite** – azeite composto por uma mistura de azeite refinado com azeite virgem (à exceção do azeite lampante), cuja acidez, expressa em ácido oleico, não seja superior a 1,00%.

De notar que um azeite só pode ser classificado numa destas categorias se obedecer a outros parâmetros físico químicos para além da acidez (*tabela 2*).^{18, 19}

Tabela 2 – Características dos azeites e sua composição ácida. (adaptado do Anexo I de ^{18, 19})

Categoria	Acidez %	Índice de Peróxidos* mEq O ₂ kg ⁻¹	Solventes Halogenados mg kg ⁻¹ (1)	Ceras mg kg ⁻¹	Ácidos gordos saturados na posição 2 dos triglicéridos %	Esteróis Totais mg kg ⁻¹	K ₂₃₂ *	K ₂₇₀ *	Delta-K*
1. Azeite virgem extra	≤ 0,80	≤ 20	M 0,20	≤ 250	M 1,3	m 1000	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
2. Azeite virgem	≤ 2,00	≤ 20	M 0,20	≤ 250	M 1,3	m 1000	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
3. Azeite lampante	> 2,00	-	m 0,20	≤ 300 (2)	M 1,3	m 1000	-	-	-
4. Azeite refinado	≤ 0,30	≤ 5	M 0,20	≤ 350	M 1,5	m 1000	-	≤ 1,10	≤ 0,16
5. Azeite	≤ 1,00	≤ 15	M 0,20	≤ 350	M 1,5	m 1000	-	≤ 0,90	≤ 0,15
Categoria	Composição Ácida (%)						Soma dos isómeros transoleicos	Soma dos isómeros transoleicos e transolenicos (%)	
	Mirístico (C14:0)	Linolénico (C18:3)	Araquídico (C20:0)	Eicosandíco	Beénico (C22:0)	Lignocérico (C24:0)			
1. Azeite virgem extra	≤ 0,05	≤ 1,00	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	
2. Azeite virgem	≤ 0,05	≤ 1,00	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	
3. Azeite virgem lampante	≤ 0,05	≤ 1,00	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	
4. Azeite refinado	≤ 0,05	≤ 1,00	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	
5. Azeite	≤ 0,05	≤ 1,00	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	

M – máximo | **m** – mínimo | **K₂₃₂** – absorvância a 232 nm | **K₂₇₀** – absorvância a 270 nm

(1) – Limite total para os compostos detetados pelo detetador de captura de eletrões. Para os compostos detetados individualmente o limite é de 0,10 mg kg⁻¹.

(2) – Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg kg⁻¹ e 350 mg kg⁻¹ são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg kg⁻¹ ou se a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

(*) – No caso do azeite lampante, os limites correspondentes podem não ser observados simultaneamente; No caso dos azeites virgens, a não observância de um dos limites correspondentes implica uma mudança de categoria, mantendo-se, porém, a classificação numa das categorias de azeites virgens.

Nota: Basta que uma das características esteja fora dos limites fixados para que o produto seja desclassificado ou declarado não conforme quanto à sua pureza.

Para determinação da pureza, e quando o K₂₇₀ ultrapassar o limite da respetiva categoria, é necessário fazer-se uma nova determinação do K₂₇₀ após passagem pela alumina.

De todos os tipos de azeite mencionados, o azeite virgem extra é conhecido como o mais resistente a fenómenos de oxidação, dado o seu alto teor em antioxidantes.²⁰ Contudo, em muitos dos países produtores de azeite, a produção de azeite virgem extra representa apenas 10% da produção total de azeite.¹¹

3.1. Produção de Azeite

A produção de azeite a partir da azeitona é ainda baseada em métodos tradicionais, embora nos últimos anos tenha havida uma maior automatização deste processo.⁸

Após colheita da azeitona, ao fim de 5-6 meses de crescimento, a mesma é lavada para remoção de folhas e fragmentos indesejados do solo recolhidos aquando da colheita da azeitona.⁸ Nesta primeira etapa, a mistura da azeitona com a água poderá dificultar posteriormente a eficácia da extração, dada a possível formação de emulsões óleo/água.⁸ Além disso, a lavagem reduz o amargor e a pungência, com consequente redução do sabor frutado do azeite, pelo que, por vezes, não é efetuada.²¹

O processamento propriamente dito do fruto só se inicia com a moagem ou esmagamento do mesmo (moenda) para promover o rebentamento celular e a libertação do óleo para extração.²¹ Nesta etapa poderão ser utilizados dois tipos de moinhos: o tradicional, de pedra, e o moinho de martelos.²¹ No primeiro caso, a moagem é mais lenta, dificultando a formação de emulsões óleo/água, bem como a elevação da temperatura a valores que poderiam adulterar o produto.²¹ Contudo, o moinho de martelos é considerado mais rentável, uma vez que tem uma velocidade de moagem mais elevada, mas pode, no entanto, conduzir a sistemas emulsionados bem como a elevadas temperaturas.²¹

A pasta resultante deste último processo é posteriormente submetida a um processo de batedura, por 30 a 60 minutos, a uma temperatura entre os 26,6 e os 30 °C, conhecido como malaxação, onde é pretendido destruir os sistemas emulsionados formados aquando da moagem, aumentando assim as gotas de óleo consideravelmente.^{8, 21}

Por fim, é realizada a extração do azeite.⁸ Esta extração é realizada normalmente por pressão (método tradicional), ou por centrífugas decantadoras.²¹ Nestas últimas, a pasta é sujeita a uma centrifugação com velocidades compreendidas entre 1200 e 1500 rpm, ocorrendo a separação do mosto oleoso dos resíduos sólidos.⁸

Posteriormente, este mosto (mistura de azeite e água) sofre centrifugação numa centrífuga vertical, separando-se por fim o azeite da água (águas ruças).⁸

O acondicionamento do produto final é feito imediatamente após a produção no caso dos azeites de elevada qualidade, sendo que os que apresentem uma qualidade inferior são ainda submetidos a novas etapas de processamento como a refinação ou a mistura com azeites virgens.⁸

3.2. Fatores que Influenciam a Qualidade do Azeite

A qualidade do azeite já não é apenas analisada tendo em conta as propriedades organoléticas finais, mas sim tendo igualmente em conta a composição química do produto obtido.⁵ Desta feita, nas últimas décadas, o interesse por perceber a influência dos compostos fenólicos presentes no azeite na qualidade deste, tem vindo a intensificar-se.⁵

Desde o crescimento e colheita da azeitona até ao acondicionamento do azeite produzido e consumo do mesmo, várias são as alterações no perfil fenólico e consequentemente na qualidade do produto, com o aparecimento ou desaparecimento de alguns dos compostos e/ou degradação de outros.⁵ Existem ainda outros fatores que têm influência direta na composição em compostos fenólicos do azeite, nomeadamente a variedade da azeitona, o índice de maturação (verificando-se um decréscimo nestes compostos em estados avançados de maturação), possíveis infestações (por exemplo, pela mosca *Dacus Olea*) e até mesmo o clima (uma mais rápida maturação como a verificada em países mais quentes, promove um enriquecimentos nestes compostos).¹²

Geralmente, azeites produzidos a partir de frutos em estados de maturação intermédios têm uma maior concentração em secoiridóides, comparativamente a outros produzidos com frutos em índices de maturação mais tardios.¹⁴ A oleuropeína é o secoiridóide mais comum na azeitona recém colhida, mas esta sofre degradação ao longo do tempo, obtendo-se hidroxitirosol, que é um indicador da perda de qualidade do azeite produzido.^{5, 14}

Também os métodos de processamento influenciam a qualidade do azeite, onde se destacam os processos de malaxação e centrifugação.¹² No que diz respeito à malaxação, se esta não for realizada totalmente na ausência de oxigénio, poderá ocorrer a degradação de determinados compostos fenólicos.²¹ Por sua vez, durante a centrifugação em centrífugas decantadoras poderão ocorrer perdas significativas de

compostos fenólicos por dissolução na água utilizada neste processo com a consequente perda de qualidade do azeite.¹²

O perfil em ácidos gordos poderá afetar igualmente a qualidade do azeite visto que azeites ricos em ácido oleico e palmítico possuem normalmente uma maior estabilidade oxidativa.¹⁴

3.3. Composição Química do Azeite

Entende-se por azeite toda e qualquer gordura, obtida diretamente do fruto da oliveira (azeitona), líquida à temperatura de 20 °C.¹⁶ Apresenta-se como um líquido oleoso, límpido e sem depósito, com um odor *sui generis*, cuja cor pode oscilar entre amarelo acastanhado ou amarelo-palha a um verde característico.¹⁶

São descritas diferentes notas sensoriais que conduzem ao característico sabor deste produto, resumindo-se o sabor como um balanço entre o 'verde' e o frutado, amargo e pungente, resultantes da presença de compostos alifáticos C6 e dos seus ésteres e à presença de polifenóis.²¹⁻²³

A composição química do azeite é dividida em compostos maioritários e compostos minoritários.⁹

No que toca aos compostos maioritários, os triacilgliceróis representam mais de 98% do peso total do azeite.⁹

Por sua vez, aproximadamente 2% do seu peso corresponde a compostos minoritários, onde cerca de 230 compostos químicos estão incluídos, tais como álcoois triterpénicos e alifáticos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis e antioxidantes.⁹

3.3.1. Triacilgliceróis/Triglicéridos

Os principais constituintes do azeite são os triacilgliceróis (TAGs) (*figura 4*), alcançando uma percentagem de 98% da massa de azeite.²

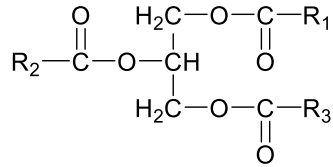


Figura 4 – Estrutura química de um Triacilglicerol (TAG). R₁, R₂ e R₃ representam as cadeias alquílicas de ácidos gordos saturados, mono ou polinsaturados.

Os ácidos gordos encontrados esterificados com o glicerol que ocorrem em maior quantidade no azeite são os ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1) (*figura 5*), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), podendo ainda ser encontrados os ácidos mirístico (C14:0), heptadecanóico (margárico) e eicosanóico (gadoleico) em quantidades vestigiais.^{1, 24} Todavia, essa mesma composição pode variar de amostra para amostra, dependo da variedade, da zona de cultivo, da latitude, do clima e do índice de maturação da azeitona.^{1, 24} Na tabela 3 podemos observar a percentagem de cada ácido gordo permitida por lei no azeite.¹⁸

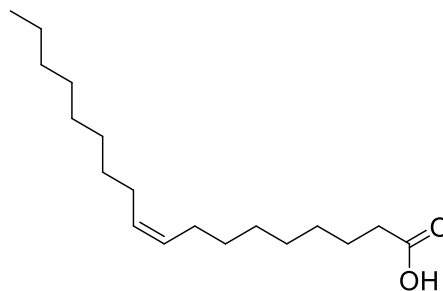


Figura 5 - Ácido Oleico (ácido octadec-9-enóico) (C18:1) (isómero cis), reportado como o mais abundante em azeite virgem extra.

De acordo com a tabela 3, o azeite é caracterizado pela presença de uma elevada proporção de ácidos gordos insaturados (aproximadamente 85%) e uma baixa proporção de ácidos gordos saturados (aproximadamente 14,5%).¹³

Tabela 3 - Características do azeite – valores percentuais permitidos por lei para os principais ácidos gordos encontrados. (adaptado de ^{16, 19})

Ácido Gordo	Valores permitidos por Lei %
Ácido Mirístico – <i>n</i> -Tetradecanoico (C14:0)	≤ 0,05
Ácido Palmítico – <i>n</i> -Hexadecanoico (C16:0)	7,5 – 20,0
Ácido Palmitoleico – Hexadec-9-enoico (C16:1)	0,3 – 3,5
Ácido Heptadecanoico (C17:0)	≤ 0,3
Ácido Heptadec-9-enoico (C17:1)	≤ 0,3
Ácido Esteárico – <i>n</i> -Octadecanoico (C18:0)	0,5 – 5,0
Ácido Oleico – Octadec-9-enoico (C18:1)	55,0 – 83,0
Ácido Linoleico – Octadeca-9,12-dienoico (C18:2)	3,5 – 21,0
Ácido Linolénico – Octadeca-9,12,15-trienoico (C18:3)	≤ 1,0

O ácido oleico um ácido gordo monoinsaturado (MUFA) é o ácido gordo que aparece em maior percentagem, entre 56 a 83% para essa porção.¹

Contém ainda uma importante quantidade de ácido linoleico (C18:2) e uma pequena quantidade de ácido linolénico (C18:3), mas que são importantes do ponto de vista nutricional, uma vez que são ácidos gordos essenciais.¹

Os TAGs encontrados em maiores proporções no azeite são os OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) e SOO (3-7%) (sendo O – ácido oleico; P – ácido palmítico; L – ácido linoleico; S – ácido esteárico).²⁴ Não estão descritos TAGs com apenas ácidos gordos saturados, nem com apenas ácidos gordos insaturados.²⁴ Também não estão descritos TAGs cuja posição 2 seja ocupada por ácido esteárico ou palmítico.²⁴

Más condições de armazenamento do azeite poderão aumentar a presença de diacilgliceróis (em concentrações entre 1 a 2,8%) originados por reações hidrolíticas.²⁴

3.3.2. Pigmentos

A coloração verde e amarela característica do azeite deve-se à substancial presença de pigmentos naturais, nomeadamente clorofilas e carotenos.²⁴

A clorofila é encontrada essencialmente sob a forma de feofitina, sendo a feofitina α a mais predominante, com concentrações entre os 3,3 e os 40 ppm.^{1, 24}

Os carotenos presentes no azeite são a luteína e o β -caroteno, podendo ainda haver vestígios de xantofilas na fração carotenoide.²⁴ O β -caroteno poderá ser encontrado em concentrações entre os 0,3 e os 4,4 ppm, enquanto a luteína apresenta uma concentração inferior, na ordem dos 1,4 ppm.¹

As concentrações destes compostos são influenciadas pela variedade e índice de maturação da azeitona, sua zona de produção e conseqüente processo de extração do azeite, bem como pelas condições de armazenamento.²⁴ Em azeite produzido com fruto em estado de maturação inicial, a feofitina α pode atingir até 42% do teor em pigmentos, enquanto em azeites produzidos com azeitona em estado de maturação avançado, a luteína apresenta-se em maior percentagem, atingindo até 61% da composição em pigmentos.²⁵

As clorofilas e os carotenos apresentam funções diferentes nos processos de peroxidação lipídica, atuando a clorofila como um pro-oxidante (dada a sua função fotossintética, na presença de luz, converte o oxigénio tripleto ($^3\text{O}_2$) em singlete ($^1\text{O}_2^*$), já o β -caroteno extingue o oxigénio singlete ($^1\text{O}_2^*$) originado.¹ São atribuídas aos pigmentos carotenoides as funções provitamínicas e anti-ulcerosas.²⁵

3.3.3. Compostos Fenólicos

Na constituição do azeite encontram-se vários compostos em quantidades pequenas. Dentro desses compostos encontram-se os compostos fenólicos.²⁶ Estes compostos estão relacionados com atividade biológica, atividade antioxidante e a estabilidade do azeite pois reagem com os radicais lipídicos.²⁶ Em termos de estrutura possuem sempre um anel aromático e, pelo menos, um substituinte hidroxilo.¹² São muitas vezes denominados por polifenóis, no entanto tal denominação está errada pois nem todos os compostos fenólicos do azeite são poliidroxifenólicos, como por exemplo o tirosol que apenas contém um único grupo hidroxilo.¹² Os compostos fenólicos são classificados em duas categorias:

- **Lipofílicos**, como os tocoferóis;
- **Hidrofilicos**, como os álcoois e ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos e secoiridóides;

3.3.3.1. Tocoferóis

Os tocoferóis, comumente designados de Vitamina E são compostos lipídicos considerados como os mais importantes antioxidantes a nível biológico, dada a sua capacidade de prevenção da peroxidação lipídica das membranas celulares e lipoproteínas. Para além da sua bioatividade, estes promovem a estabilidade do azeite durante os processos de armazenamento e processamento (por exemplo, fritura), protegendo-o da degradação oxidativa.¹ Tanto em alimentos como nos sistemas biológicos, observa-se um efeito sinérgico na atividade antioxidante dos tocoferóis na presença de outros antioxidantes, nomeadamente de polifenóis.^{1, 24}

Os tocoferóis são compostos metilados derivados do tocol²⁷ e são nomeados com os prefixos α , β , γ e δ , dependendo do número e posição dos grupos metilo fixados na estrutura do anel cromanol.²⁸⁻³⁰ O número e posição do grupo metilo no tocol influencia a sua atividade a nível biológico, sendo o α -tocoferol (*figura 6*) a forma mais ativa *in vivo*.³⁰

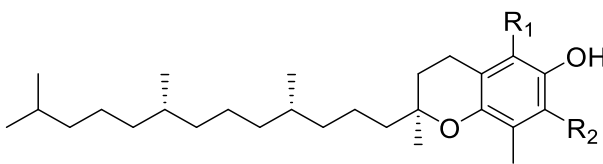


Figura 6 - Estrutura química de um Tocoferol.

R ₁	R ₂	Tocoferol
-CH ₃	-CH ₃	α -tocoferol
-CH ₃	-H	β -tocoferol
-H	-CH ₃	γ -tocoferol
-H	-H	δ -tocoferol

No entanto, uma vez que todos os tocoferóis apresentam atividade antirradicalar semelhante, a atividade antioxidante dos tocoferóis em alimentos vai depender da estrutura físico-química destes fenóis, nomeadamente da presença de metais, da sua concentração e das condições de processamento a que estes são submetidos.^{27, 31} Aquando a adição de um tocoferol a determinado substrato poderá ainda verificar-se uma atividade pro-oxidante a partir de determinadas concentrações.³¹

O α -tocoferol é a forma predominante no azeite, compreendendo cerca de 90% do teor em tocoferóis²⁴, podendo encontrar-se na literatura concentrações máximas de 300 ppm.^{1, 32} Durante os processos de produção do azeite, a colheita da azeitona, a refinação e a hidrogenação são apontadas como as principais causas para a diminuição dos níveis de tocoferol^{1, 24}, perdendo-se entre 30 a 40 % de tocoferóis e tocotrienóis²⁸, podendo haver igualmente uma perda substancial deste composto já após o acondicionamento do azeite, dada a sua sensibilidade à luz e ao ar.³³

3.3.3.2. Álcoois Fenólicos

O hidroxitirosol (2-(3,4-diidroxifenil)etanol – (3,4-DHPEA)) (*figura 7A*) e o tirosol (2-(*p*-hidroxifenil)etanol - (*p*-HPEA)) (*figura 7B*) são descritos como os principais álcoois fenólicos presentes no azeite virgem.^{9, 34, 35} A par destes, é ainda encontrado no azeite virgem um derivado do hidroxitirosol, o acetato de hidroxitirosol (etanoato de (3,4-diidroxifenil)etilo) (*figura 7C*).^{35, 36}

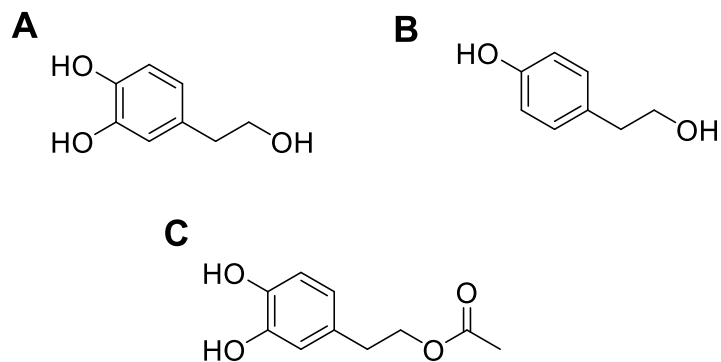


Figura 7 - Estrutura química dos Álcoois Fenólicos e derivado: hidroxitirosol (A); tirosol (B); acetato de hidroxitirosol (C).

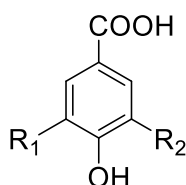
Os álcoois fenólicos têm a particularidade de ser encontrados essencialmente em frutos da família Oleaceae.²

Estes compostos apresentam uma baixa concentração em azeites com pouco tempo de armazenamento, verificando-se um aumento da mesma com o aumento do tempo de prateleira.⁹ Desta feita, a concentração de hidroxitirosol em azeite é um dos indicadores da idade do azeite.¹¹ Este aumento deve-se à hidrólise dos secoiridóides que contêm 3,4-DHPEA e *p*-HPEA na sua estrutura molecular.^{9, 37}

Os álcoois fenólicos apresentam atividade biológica como antioxidantes, antitumorais e antiaterosclerótica.^{38, 39}

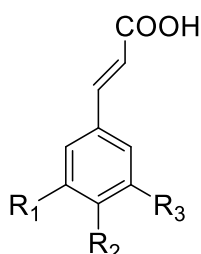
3.3.3.3. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos químicos com uma estrutura básica de C6-C1 (ácidos benzoicos) (*figura 8*) e C6-C3 (ácidos cinâmicos) (*figura 9*).^{9, 11}



R ₁	R ₂	Ácido Fenólico
-OCH ₃	-H	Ácido Vanílico
-OCH ₃	-OCH ₃	Ácido Siríngico

Figura 8 - Estrutura química de Ácidos Benzoicos.



R ₁	R ₂	R ₃	Ácido Fenólico
-H	-H	-H	Ácido Cinâmico
-H	-OH	-H	Ácido <i>p</i> -Cumárico
-OH	-OH	-H	Ácido Cafeico

Figura 9 - Estrutura química de Ácidos Cinâmicos.

Apesar de serem componentes minoritários, estes ácidos, tais como ácido vanílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, protocatecuico, sinático e *p*-hidroxibenzoico historicamente foram os primeiros a ser identificados no azeite virgem.⁹ No azeite, o teor em ácidos fenólicos é frequentemente mais baixo do que 1 mg kg⁻¹ de amostra.¹

3.3.3.4. Flavonoides

Na composição fenólica do azeite virgem tem sido descrita a presença de flavonoides, tal como a luteolina e a apigenina.⁹ Um flavonoide consiste normalmente num anel benzénico (A) condensado com um heterocíclico de seis lados (C) que possui um grupo fenilo (B) como substituinte na posição 2 (*figura 10*).^{40, 41} Compõem uma família de aproximadamente 4000 compostos, constituindo o grupo de fenóis vegetais mais comum e mais largamente distribuído nas plantas com capacidade antioxidante.^{42,}

⁴³ Estes compostos são responsáveis pela cor de frutos, flores e folhas.⁴⁰

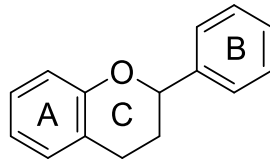
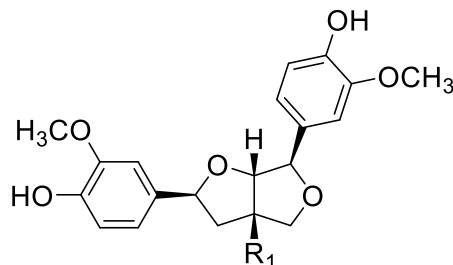


Figura 10 - Estrutura química de um Flavonoide.

Os flavonoides, para além de terem atividade antioxidante, em muitos alimentos apresentam diversas funções bioquímicas e farmacológicas, nomeadamente anti-inflamatórias, anti-oxidativas e anti-carcinogénicas, bem como anti-trombóticas e anti-plaquetárias.^{41, 42, 44, 45}

3.3.3.5. Lignanos

Os últimos compostos fenólicos a serem isolados e identificados em azeite virgem foram os lignanos¹. Os mais frequentes no azeite são o (+)-1-acetoxipinoresinol, o (+)-1-pinoresinol e o (+)-1-hidroxipinoresinol (figura 11).^{9, 46}



R ₁	Lignano
-OCOCH ₃	(+)-1-acetoxipinoresinol
-H	(+)-1-pinoresinol
-OH	(+)-1-hidroxipinoresinol

Figura 11 - Estrutura química dos Lignanos.

Os lignanos são produtos naturais bastante conhecidos, pois encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 200 compostos identificados.⁴⁷ Hipoteticamente, qualquer planta capaz de produzir lignina apresentará lignanos, dada a probabilidade de apresentar enzimas capazes de fazer a ligação entre as duas unidades fenilpropanoides constituintes do mesmo.⁴⁸

Estruturalmente, estes compostos fenólicos são biossintetizados a partir de unidades fenilpropanoides (C6-C3) (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) por dimerização e acoplamento oxidativo.^{47, 48}

Os lignanos apresentam diversas atividades biológicas, nomeadamente antitumoral, antimetabólica e antiviral.^{47, 49} Nas plantas, estes compostos apresentam capacidades anti-helmínticas e antifúngicas contra diversos parasitas, tais como a

Forsythia spp.⁴⁸ No azeite virgem, o (+)-1-pinoresinol (estruturalmente mais simples, composto por um dímero de álcool coniferílico)⁴⁸ é descrito como o lignano mais abundante.¹

3.3.3.6. Secoiridóides

Os polifenóis presentes em maior concentração no azeite são os secoiridóides. Estes são uma subclasse dos iridóides obtidos por clivagem do anel ciclopentano na ligação 7,8 e são restritos à família Oleaceae.⁵⁰

Na azeitona, os secoiridóides mais importantes são a oleuropeína (*figura 12A*) e o ligstrósido (*figura 12B*), podendo atingir até 14% do peso seco desta.

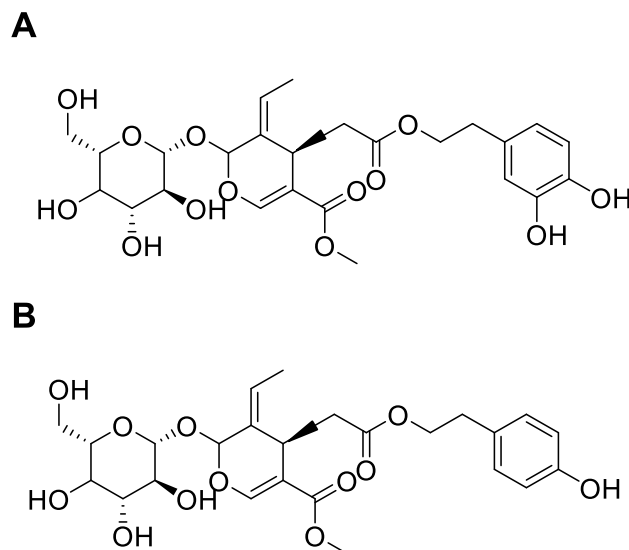


Figura 12 - Estrutura química da Oleuropeína (A) e seu Ligstrósido (B).

No entanto, no azeite os secoiridóides mais abundantes são os derivados da oleuropeína obtidos por hidrólise catalisada por β -glicosidase aquando do processo de extração^{20, 51} como o 3,4-DHPEA-EA (elenoato de hidroxitirosilo) (*figura 13B*) e o 3,4-DHPEA-EDA ou oleoceína (forma dialdeídica do elenoato de hidroxitirosilo) (*figura 13A*).^{35, 38, 51} Outro secoiridóide presente no azeite em grande quantidade é o oleocantal (*p*-HPEA-EDA) (*figura 13C*) que deriva do ligstrósido aglicona.^{1, 51-53} Um outro derivado do ligstrósido aglicona presente em quantidades vestigiais no azeite é o *p*-HPEA-EA (*figura 13D*).²

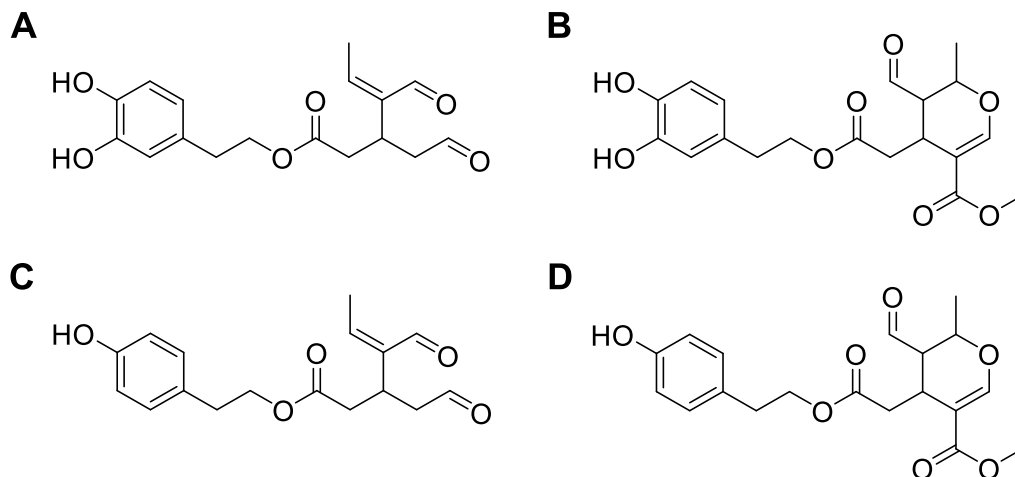


Figura 13 - Estrutura química dos Secoiridóides: 3,4-DHPEA-EDA (A); 3,4-DHPEA-EA (B); *p*-HPEA-EDA (C); *p*-HPEA-EA (D).

Estes compostos influenciam em grande, parte, as propriedades sensoriais características quer do azeite (conferindo-lhe um perfil pungente, amargo e picante), quer da própria azeitona⁵⁴ e conferem ao azeite uma resistência elevada à auto-oxidação e a foto-oxidação.^{9, 54}

A quantidade e a composição em secoiridóides no azeite é variável de amostra para amostra, dependendo do estado de maturação e da variedade da azeitona.^{20, 54}

Os secoiridóides derivados do hidroxitirosol apresentam uma elevada atividade antioxidante no azeite, apresentando o 3,4-DHPEA-EDA e o 3,4-DHPEA-EA uma capacidade antioxidante⁵⁵, 5 a 7 vezes superior à do α -tocoferol.

Para além da capacidade antioxidante, estes secoiridóides apresentam também bioatividade, nomeadamente anti-inflamatória, antiaterosclerótica e antimicrobiana.^{9, 37, 52, 56} Já os derivados do tirosol não apresentam atividade antioxidante nos alimentos, mas tem sido descrita importante bioatividade. No caso do oleocantal, o seu efeito anti-inflamatório é semelhante ao do ibuprofeno (anti-inflamatório não esteroide).⁵²

3.4. Alegação de saúde

A dieta mediterrânea e o consumo de azeite têm sido associados em diversos estudos de longevidade e ao risco reduzido de morbimortalidade.⁵⁷ O uso do azeite como principal gordura nesta dieta é frequente nos países do sul da Europa, sendo os efeitos da sua ingestão, já conhecidos desde a antiguidade, somente atribuídos ao alto teor em ácido oleico desta substância.⁵⁷

Contudo, estudos recentes atribuem ao azeite novas propriedades farmacológicas e nutricionais, nomeadamente atividade antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas.^{57, 58} Estes efeitos são atribuídos à fração fenólica do azeite, onde se destacam as formas livres e associadas derivadas das estruturas dos secoiridóides de hidroxitirosol e tirosol.^{57, 58}

Dada a importância destes compostos para o consumidor, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) autoriza que a informação relativa à presença destes compostos/substâncias/nutrientes, bem como os seus benefício(s) para a saúde de quem os consome seja veiculada através de alegações nos rótulos e/ou informações promocionais do produto em questão.⁵⁸

O Regulamento (UE) N.º. 432/2012 da Comissão Europeia de 16 de maio de 2012 define a lista de alegações de saúde permitidas nos alimentos, sendo que para o azeite as referidas alegações dizem respeito aos seus polifenóis e vitamina E (α -tocoferol), ao ácido oleico presente, bem como aos ácidos gordos monoinsaturados e poliinsaturados (*tabela 4*).⁵⁸

Tabela 4 - Alegações de saúde e condições de uso autorizadas pela EFSA e presentes no Regulamento (UE) N.º. 432/2012 da Comissão Europeia de 16 de maio de 2012 relativas ao azeite e respetiva substância ao qual devem estas ser associadas. (*adaptado de* ⁵⁹)

Substância	Alegação	Condições para o uso da alegação
Ácidos Gordos monoinsaturados e/ou poliinsaturados	A substituição de gorduras saturadas por gorduras insaturadas na dieta contribui para a manutenção dos níveis normais de colesterol no sangue.	A alegação deve ser usada somente em alimentos cujo teor em ácidos gordos insaturados seja alto, conforme referido na alegação "HIGH UNSATURATED FAT" presente no anexo do Regulamento (CE) N.º. 1924/2006. Ácidos Gordos Monoinsaturados - $\geq 45\%$ ⁶⁰ Ácidos Gordos Insaturados - $\geq 70\%$ ⁶⁰

<p>Ácido Oleico</p>	<p>A substituição de gorduras saturadas por gorduras insaturadas na dieta contribui para a manutenção dos níveis normais de colesterol no sangue.</p> <p>O ácido oleico é um ácido gordo insaturado.</p>	<p>A alegação deve ser usada somente em alimentos cujo teor em ácidos gordos insaturados seja alto, conforme referido na alegação “HIGH UNSATURATED FAT” presente no anexo do Regulamento (CE) Nº. 1924/2006.</p> <p>Ácidos Gordos Monoinsaturados - $\geq 45\%$⁶⁰</p>
<p>Polifenóis do azeite</p>	<p>Os polifenóis do azeite contribuem para a proteção ao stress oxidativo nos lípidos presentes no sangue.</p>	<p>A alegação deve ser usada apenas em azeites que contenham no mínimo 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (por exemplo, oleuropeína e tirosol) por cada 20 g de azeite. De modo a ser suportada a informação da alegação, deverá ser fornecido ao consumidor informação relativa ao benefício do consumo diário de 20 g de azeite.</p>
<p>Vitamina E (α-tocoferol)</p>	<p>A vitamina E contribui para a proteção celular contra o stress oxidativo.</p>	<p>A alegação deve ser usada apenas em alimentos que tenham no mínimo uma fonte de vitamina E, como referido na alegação “SOURCE OF (NAME OF VITAMIN/S) AND/OR (NAME OF MINERAL/S) presente no anexo do Regulamento (CE) Nº. 1924/2006.</p> <p>Porção média fornecida pelo alimento - ≥ 75 ppm⁶¹</p>

Todas as alegações presentes nos produtos deverão ser de fácil compreensão para o consumidor, demonstrando ao mesmo, os efeitos benéficos e nutricionais do alimento, baseado em evidências científicas.⁵⁸

As alegações de saúde nos diferentes produtos constituem atualmente uma importante alavanca em questões de marketing, aumentando a vontade de compra no consumidor, dando-lhe igualmente a confiança em relação à alta qualidade do produto, justificando, por vezes, o alto preço apresentado.⁵⁸

Todavia, a problemática atual reside na falta de métodos técnico-científicos de execução simples, definitivos e de fácil acesso aos diversos produtores oleícolas para a determinação dos teores em determinadas substâncias químicas presentes no azeite,

nomeadamente polifenóis.⁵⁸ Tal problemática constitui um entrave à disponibilização das alegações de saúde nos azeites produzidos.⁵⁸

4. Oxidação Lipídica

Os alimentos contendo lípidos sofrem oxidação quando em contacto com o ar, resultando numa diminuição do valor nutricional e numa deterioração qualitativa e sensorial do produto, com a formação de odores e sabores indesejados (como, por exemplo, o ranço) (figura 14).⁶²⁻⁶⁵

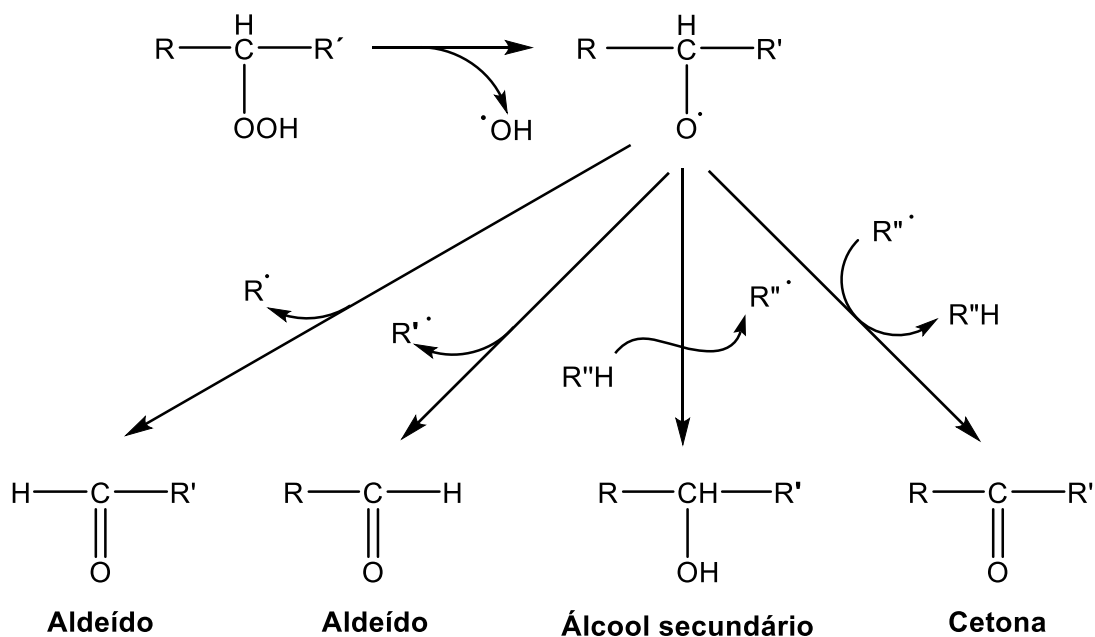


Figura 14 - Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis.

Também em sistemas biológicos, a oxidação dos compostos lipídicos têm requerido a atenção de inúmeros investigadores dada a associação destes fenómenos e conseqüente formação de espécies radiculares de oxigénio com o processo de envelhecimento, cancro, aterosclerose e inflamação.^{64, 66}

4.1. Auto-oxidação

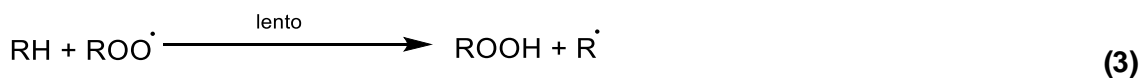
O processo de auto-oxidação é composto por três etapas elementares: iniciação, propagação e terminação.⁶⁴ A etapa de iniciação é caracterizada pela formação de radicais livres a partir da abstração de um H de um ácido gordo presente num alimento (equação 1). Já a propagação é caracterizada pela reação desses mesmos radicais, com o oxigénio atmosférico (O₂) com conseqüente formação de hidroperóxidos (equações 2

e 3), e, por fim, a terminação é caracterizada pela formação de produtos não radicalares (equações 4, 5 e 6).^{2, 67}

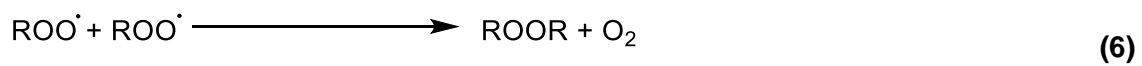
Iniciação



Propagação



Terminação

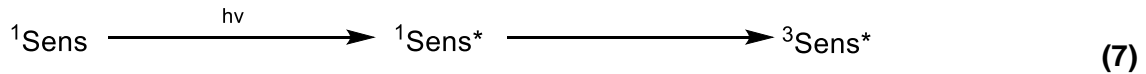


Na etapa de iniciação, a perda do hidrogénio dos compostos lipídicos (RH) pode ser causada pela presença de metais, radiação ou calor, resultando dessa reação um radical lipídico (R·).^{63, 64} Por sua vez, esse radical, na etapa de propagação, reage com o oxigénio formando radicais alquilperoxílicos (ROO·).^{64, 67} Ainda nesta etapa, o radical peroxilo (ROO·) reage novamente com os compostos lipídicos (RH), dando origem a hidroperóxidos (ROOH) (produtos primários da auto-oxidação).^{64, 67} Na etapa final, a de terminação, a reação entre produtos radicalares formados, lipídicos e alquilperoxílicos (R· e ROO·) conduzem à formação de produtos não radicalares estáveis.^{63, 64, 67, 68}

4.2. Foto-oxidação

Os processos de foto-oxidação provocam a deterioração dos azeites, dada a presença de pigmentos na sua composição tais como a clorofila e a feofitina (fotossensibilizadores).^{2, 64} Embora estes compostos possam atuar como antioxidantes na ausência de luz, na presença de luz atuam como pró-antioxidantes.²

Durante os processos de foto-oxidação, os sensibilizadores (Sens) absorvem radiação visível ou UV-próxima, sendo convertidos ao seu estado excitado de singlete.² Por sua vez, estes são posteriormente convertidos na sua forma excitada de tripleto (³Sens*) (equação 7).²

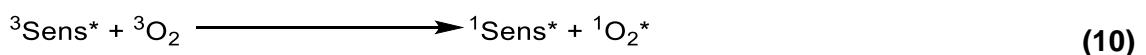


Por sua vez, estes reagem de duas formas distintas com o substrato lipídico (RH), dependendo se são sensibilizadores Tipo I (equações 8 e 9) ou do Tipo II (equações 10 e 11):²

- **Sensibilizadores Tipo I:** o sensibilizador em estado excitado (³Sens*), reage diretamente com o substrato lipídico (RH), formando radicais por transferência de átomos de hidrogénio ou por transferência eletrónica.² Os radicais intermediários formados poderão interagir agora com o oxigénio em estado tripleto (³O₂), formando radicais hidroperóxilos. São moléculas que quando ativadas pela radiação, reagem diretamente com o substrato lipídico que, por sua vez, consegue reagir com o oxigénio (equações 8 e 9);²



- **Sensibilizadores Tipo II:** o sensibilizador em estado tripleto (³Sens*) transfere a energia para o oxigénio em estado tripleto (³O₂), transformando-o em oxigénio singlete (¹O₂) que, por sua vez, pode vir a reagir com o substrato lipídico, originando hidroperóxidos (equações 10 e 11).²



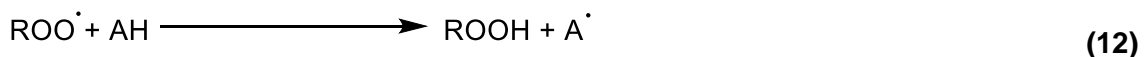
5. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que prolongam a durabilidade dos alimentos, protegendo-os contra os processos de oxidação.⁶⁵

Os antioxidantes podem ter vários mecanismos de ação, nomeadamente inibir os radicais livres, complexar os iões metálicos capazes de catalisar reações de oxidação lipídica, ou captar o oxigénio.²⁸ São ainda classificados como antioxidantes primários e antioxidantes secundários, de acordo com o seu modo de ação:²⁸

- **Antioxidantes primários** – atuam como bloqueadores das reações de oxidação lipídica em cadeia por reação com os radicais lipídicos de elevada energia, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis;²⁸
- **Antioxidantes secundários** – atuam por outro mecanismo que não o de reagir com os radicais lipídicos.²⁸

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários dada a sua capacidade em reagir com radicais lipídicos por doação de um átomo de hidrogénio (*equações 12 a 15*).²⁸



A energia de ativação destas reações está diretamente relacionada com a energia de dissociação das ligações A-H e R-H.²⁸ Contudo a eficiência antioxidante dos compostos aumenta com a diminuição da resistência A-H.²⁸

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos advém do facto de os radicais fenoxilo, ao doarem o H aos radicais lipídicos, formarem radicais que são estabilizados pela deslocalização do eletrão desemparelhado ao longo do anel aromático (*figura 15*).²⁸

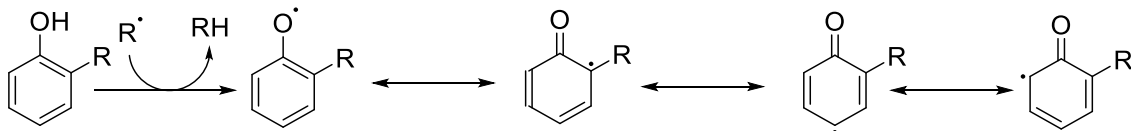


Figura 15 - Estabilização do radical fenóxilo por deslocalização eletrónica (R = grupo alquilo).

Os compostos fenólicos, por si só, são inativos, no entanto a substituição nestes com grupos alquilo nas posições 2, 4 e/ou 6 aumenta a densidade eletrónica no seu grupo hidroxilo por um efeito indutivo, conduzindo, deste modo, a um aumento da reatividade com o radical lipídico. Todavia, quando estes grupos alquilo são volumosos diminuem a reatividade do radical formado por impedimento estereoquímico.

Desta feita, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente relacionada com a estabilidade por ressonância dos radicais fenóxilo formados. Normalmente, a presença de um segundo grupo hidroxilo, particularmente na posição orto, conduz a um aumento da atividade antirradical das moléculas. Este aumento pode ser explicado pela possibilidade do radical formado vir a ser estabilizado por uma ponte de hidrogénio (*figura 16*) ou pela sua capacidade de fornecerem mais um hidrogénio que pode neutralizar mais um radical, com a produção de moléculas não radicalares, logo não reativas.

Derivados do 1,2-hidroxibenzeno

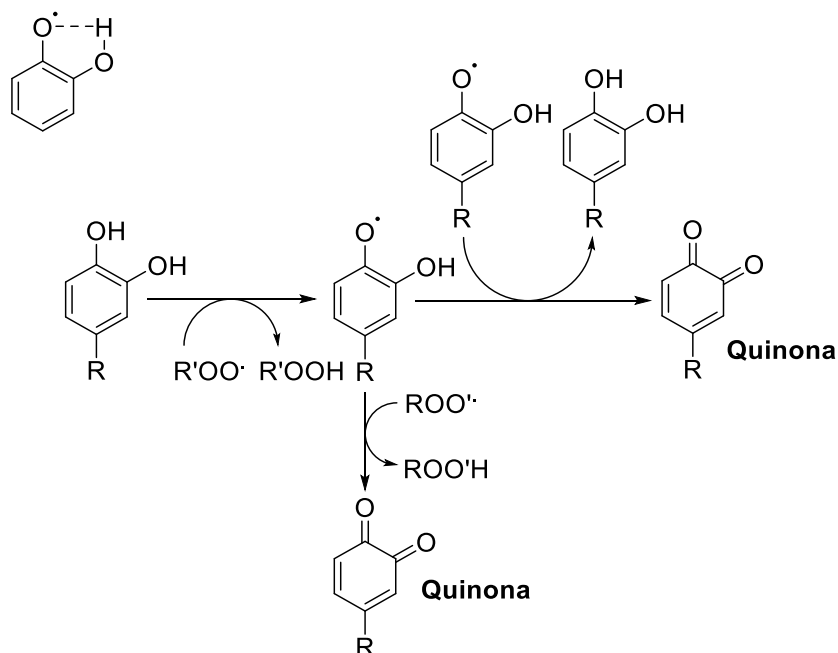


Figura 16 - Mecanismo de atuação dos antioxidantes catecólicos.

II. Objetivos

A baixa incidência em doenças cardio e neurovasculares nos países mediterrânicos, onde a principal gordura consumida é o azeite, tem levado à investigação do potencial papel protetor dos compostos fenólicos presentes no azeite contra este tipo de patologias.

As características físico-químicas do azeite virgem extra são ditadas por diversos fatores tais como as condições de cultivo, a colheita da azeitona e o modo de extração. Além destes, o índice de maturação do fruto colhido e a variedade de oliveira utilizada na sua obtenção têm-se mostrado fatores determinantes na qualidade do produto, influenciando a quantidade de compostos fenólicos do mesmo.

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar pela primeira vez o conteúdo em antioxidantes, tanto tocoferóis como polifenóis, de azeites virgem extra monovarietais de origem portuguesa, obtidos a partir das variedades Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Madural e Verdeal, provenientes do território nacional: Norte Alentejano e Reguengos de Monsaraz (Herdade do Esporão) e Trás-os-Montes, Vila Flor (Acushla, S.A.), já embalados e prontos para comercialização.

De modo a verificar se os azeites analisados se encontravam em boas condições, avaliou-se o nível de oxidação e a acidez dos mesmos.

Para além da avaliação do conteúdo em antioxidantes, pretendeu-se igualmente avaliar qual o impacto do índice de maturação no conteúdo destes compostos fenólicos.

Por último, determinou-se a composição em ácidos gordos dos azeites monovarietais de modo a perceber qual a influência desta composição no conteúdo em antioxidantes dos mesmos.

Dada a importância dos compostos antioxidantes para a estabilidade, características organolépticas e qualidade nutricional dos azeites produzidos, espera-se que o conhecimento do conteúdo em antioxidantes dos vários azeites monovarietais venha a ser utilizado na seleção das variedades a utilizar na manutenção e cultivo de novos olivais com vista à produção de azeites de elevada qualidade com a possível rotulagem contendo a alegação de saúde. De facto, as alegações de saúde atribuídas azeites ricos em polifenóis é uma importante alavanca de marketing em países como os Estados Unidos, uma vez que aumentam a disposição do consumidor para pagar por um produto de valor acrescentado.

III. Material e Métodos

1. Materiais

Todos os solventes usados nas extrações eram de qualidade “Puro” e os usados nas cromatografias em coluna, UHPLC e GC-FID foram de qualidade “Para Análise (PA)” da Merck®, Sigma Aldrich® ou da Fluka®. Além dos solventes utilizados, adquiriram-se comercialmente os seguintes compostos:

- Hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), Seprox Biotech®
- Tirosol (*p*-hidroxifeniletanol), Sigma Aldrich®
- Acetato de hidroxitirosol 99% (etanoato de 2-(3,4-hidroxifeniletilo)), Seprox Biotech®
- Ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico), Sigma Aldrich®
- α -tocoferol 97%, Sigma Aldrich®
- Éter dietílico 99.9%, Panreac®
- Etanol 99,8%, Fisher Chemical®
- Trifluoreto de boro:complexo trifluoreto de boro-metanol (52:52, m/m) ($\text{BF}_3 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$), Alfa Aesar®
- Ácido butírico 99%, Alfa Aesar®
- Ácido linoleico 60-74%, Sigma Aldrich®
- Ácido oleico 99%, Sigma Aldrich®
- Ácido esteárico 99%, Griffin & George®
- Palmitato de metilo 95%, Acros Organics®
- Caprato de metilo 98+%, Acros Organics®
- Miristato de metilo 99%, Acros Organics®
- Laurato de metilo 96%, Acros Organics®

Utilizou-se para a análise dos compostos purificados, a cromatografia em camada fina (TLC) e a ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN).

Nas purificações por cromatografia em coluna utilizou-se gel de sílica 0,040-0,063 mm (Merck®).

As placas de TLC usadas na identificação dos compostos foram de gel de sílica em suporte de alumínio 60 S254 (Merck®).

A revelação das placas de TLC foi efetuada de dois modos:

- Irradiação de Luz UV-Vis;
- Exposição a vapor de I_2 .

Os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram traçados usando acetona deuterada (Eurisotop®) como solvente, num espectrómetro digital de Ressonância Magnética Nuclear a 400 MHz (Bruker Avance III 400).

As análises por UHPLC foram efetuadas num cromatógrafo Vanquish® (Thermo Scientific®), uma coluna C18 LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 250 mm x 4 mm (Merck®), acoplados a um detetor UV-Vis de fotodíodos Vanquish® (Thermo Scientific®) e a uma bomba quaternária Vanquish® (Thermo Scientific®).

As análises por CG-FID foram realizadas num cromatógrafo Perkin Elmer® modelo "Clarus 480 Gas Chromatograph", equipado com uma coluna BPX70 da SGE® específica para FAMES.

1.1. Obtenção e descrição das amostras de azeite

Todas as amostras de azeite analisadas eram compostas por azeite do tipo extra virgem monovarietal, armazenado em recipientes de vidro âmbar e prontos para comercialização.

Foram gentilmente cedidas para análise trinta amostras de seis variedades distintas – Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Madural e Verdeal – sendo vinte e quatro delas provenientes da Herdade do Esporão, região do Alto Alentejo, e seis provenientes da Quinta do Prado (Vila Flor), região de Trás-os-Montes (exploração oleícola da Acushla, S.A.).

As diferentes colheitas e conseqüente produção foram efetuadas entre outubro de 2018 e janeiro de 2019 (conforme descrito na *tabela 5*), a partir de fruto em cinco estados de maturação distintos (IM₁, IM₂, IM₃, IM₄, IM₅), tendo as amostras sido armazenadas nos recipientes originais a 4 °C até análise.

Tabela 5 - Semanas de colheita das diferentes amostras e respetivo índice de maturação.

Data de Colheita	Semanas	Índice de Maturação (IM _x)
22/10/2018 – 26/10/2018	1	-
29/10/2018 – 09/11/2018	2-3	IM ₁
12/11/2018 – 24/11/2018	4-5	IM ₂
26/11/2018 – 30/11/2018	6	-
03/12/2018 – 14/12/2018	7-8	IM ₃
17/12/2018 – 04/01/2019	9-10	IM ₄
07/01/2019 – 18/01/2019	11-12	IM ₅

Nota: As semanas 1 e 6 não foram consideradas neste estudo dado o baixo número de amostras recolhidas para esses períodos, não tendo sido atribuído índice de maturação às mesmas.

1.2. Compostos Fenólicos

O hidroxitirosol, tirosol, acetato de hidroxitirosol e ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico) a utilizar como padrões foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich®). Todavia, os polifenóis oleuropeína, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA foram isolados a partir de folhas de oliveira (*Olea Europaea* L.) devido ao preço muito elevado destes compostos no mercado

As folhas foram colhidas durante o mês de novembro (após colheita da azeitona), na região de Trás-os-Montes e transportadas para o laboratório imediatamente em caixas abertas, ao abrigo da luz, sem pressão física, de modo a evitar o trauma das mesmas. Após a chegada ao laboratório, processaram-se imediatamente as folhas termicamente.

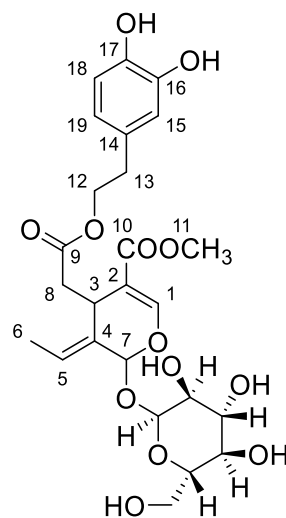
1.2.1. Extrações de oleuropeína de folhas de *Olea europaea* L.

Para a extração de oleuropeína, colocaram-se as folhas na estufa, em caixa aberta, a 41 °C, durante 24 horas. Terminado esse período, as mesmas foram maceradas em etanol durante 5 dias. Filtrou-se o extrato por gravidade e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 30 °C.

Dissolveu-se o extrato em 300 mL de uma solução de acetona/água (50:50, v/v), lavou-se sucessivamente com 6 porções de 300 mL de *n*-hexano e depois extraiu-se com 6 porções de 300 mL de acetato de etilo. Secou-se a fase orgânica resultante com

sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 30 °C.

Efetuuou-se a purificação do produto final por cromatografia em coluna de gel de sílica 0,040-0,063 mm (Merck®), usando como eluente uma solução de clorofórmio:metanol (4:1, v/v). A purificação foi monitorizada por cromatografia em camada fina (TLC) utilizando o mesmo eluente e revelou-se por irradiação de luz UV-Vis e por exposição a vapor de I₂. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e a uma temperatura inferior a 30 °C. O produto obtido foi identificado por ¹H RMN e por ¹³C RMN como sendo oleuropeína.



¹H RMN (CD₃OCD₂, 200 MHz): δ 7,46 (s, 1H, C=CO-H), 6,74 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 6,73 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H), 6,51 (dd, 1H, ³*J* = 8,0 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz Ar-H), 6,01 (q, 1H, ³*J* = 7,1 Hz, C=C-H), 5,92 (d, 1H, ⁴*J* = 1,3 Hz, O-CH-O), 4,84 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H_{1Glu}), 4,65-4,20 (6H, C-OH), 4,12 (m, 2H, CH₂-O), 3,96 (m, 1H, CH-C=), 3,67 (s, 3H, CH₃-C=C), 3,40 (m, 5H, CH-OH), 3,07 (s, broad, 2H, OH), 2,74 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, Ar-CH₂), 2,70 (dd, 1H ²*J* = 14,3 Hz, ³*J* = 4,0 Hz, CH_a-C=O), 2,39 (dd, 1H, ²*J* = 14,3 Hz, ³*J* = 9,5 Hz CH_b-C=O), 1,66 (dd, 3H, ³*J* = 7,1 Hz, ⁴*J* = 1,3 Hz, CH₃-C=C-C) ppm.

¹³C RMN (CD₃OCD₂, 50,3 MHz): δ 171,6 (CH₂-C=O);, 167,2 (=CH-C=O), 154,2 (C=CH-O), 145,7 (C₁₆ Ar-O), 144,5 (C₁₇ Ar-O), 130,4 (C₁₄ Ar-CH₂), 130,3 (C=CH-CH₃), 124,1 (CH₃-CH=C), 121,1 (C₁₉ Ar-H), 116,8 (C₁₈ Ar-H), 116,1 (C₁₅ Ar-H), 109,14 (=CH-O), 100,6 (CHOH-CH-O), 94,6 (O-CH-O-CH=C), 77,9 (CH-OH), 77,6 (CH-OH), 74,5 (CH-OH), 71,4 (CH-OH), 66,1 (CH₂-OCO), 62,8 (CH₂-OH), 51,5 (COO-CH₃), 40,7 (CH₂-C=O), 35,0 (Ar-CH₂), 31,4 (CH-CH₂-C=O), 13,5 (CH₃) ppm.

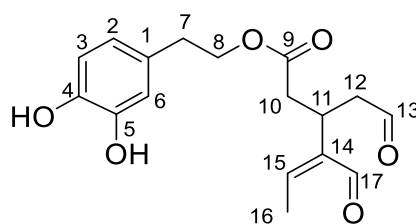
1.2.2. Extração de 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA de folhas de *Olea europaea* L.

Para a extração do 3,4-DHPEA-EDA e do 3,4-DHPEA-EA, colocaram-se as folhas na estufa, a 41 °C, em sacos fechados sob vácuo, durante 24 horas. Após esse intervalo de tempo, maceraram-se as folhas em etanol durante 5 dias, ao abrigo da luz. Filtrou-se o extrato por gravidade e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 30 °C.

Dissolveu-se o extrato com 300 mL de uma solução de acetona/água (50:50, v/v), lavou-se sucessivamente com 3 porções de 200 mL de *n*-hexano e extraiu-se com cinco porções de 300 mL de clorofórmio. Secou-se a fase orgânica recolhida com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 30 °C.

Purificou-se o produto final por cromatografia em coluna de gel de sílica 0,040-0,063 mm (Merck®) utilizando como eluente uma solução de éter dietílico/metanol (35:1, v/v). A purificação foi monitorizada por cromatografia em camada fina (TLC) utilizando o mesmo eluente e efetuou-se a revelação por irradiação de luz UV-Vis e por exposição a vapor de I₂. Obtiveram-se duas frações que após evaporação do solvente foram identificadas por ¹H RMN como sendo 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA.

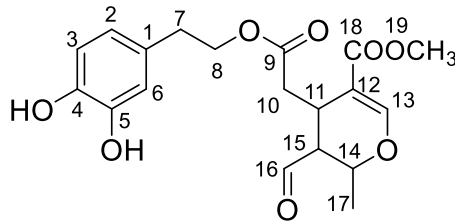
- **RMN do 3,4-DHPEA-EDA**



¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 9,63 (s, 1H, H₁₇), 9,19 (d, *J*_{13,12} = 2,0 Hz, 1H, H₁₃), 6,78 (d, *J*_{3,2} = 8,0 Hz, 1H, H₃), 6,71 (d, *J*_{6,2} = 2,0, 1H, H₆), 6,64 (q, *J*_{15,16} = 6,8 Hz, 1H, H₁₅), 6,59 (dd, *J*_{2,3} = 8,0, *J*_{2,6} = 2,0 Hz, 1H, H₂), 4,22 (m, 1H, H_{8a}), 4,17 (m, 1H, H_{8b}), 3,62 (dt, 1H, H₁₁), 2,93 (dd, *J* = 18,4, 1H, H_{12b}), 2,76 (m, 1H, H_{12a}), 2,78 (m, 2H, H₇), 2,70 (dd, 1H, H_{10a}), 2,60 (dd, *J* = 15,6, 1H, H_{10b}), 2,05 (d, *J*_{16,15} = 7,2 Hz, 3H, H₁₆) ppm.

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 200,61 (C₁₃), 195,47 (C₁₇), 171,58 (C₉), 154,91 (C₁₅), 143,17 (C₅), 142,79 (C₄), 142,50 (C₁₄), 130,11 (C₁), 120,82 (C₂), 115,83 (C₆), 114,85 (C₃), 64,86 (C₈), 45,88 (C₁₂), 36,61 (C₁₀), 33,92 (C₇), 26,85 (C₁₁), 14,96 (C₁₆) ppm.

- **RMN do 3,4-DHPEA-EA**



¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 9,67 (s, 1H, H_{16a}), 9,54 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, H_{16b}), 7,55 (s, 1H, H_{13a}), 7,50 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, H_{13b}), 6,74 (d, *J* = 8,0, 1H, H₃), 6,73 (d *J* = 1,9 Hz, 1H, H₆), 6,57 (dd, *J* = 8,0, *J* = 1,9 Hz, 1H, H₂), 4,57 (qd, *J* = 6,7, *J* = 5,7 Hz, 1H, H₁₄), 4,20 (m, 2H, H₈), 3,66 (s, 3H, H₁₉), 3,37 (m, 1H, H₁₁), 2,84 (dd, *J* = 1,9 Hz, 1H, H_{10a}), 2,76 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, H₇), 2,65 (m, 1H, H₁₅), 2,35 (m, 1H, H_{10b}), 1,55 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, H_{17a}), 1,38 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, H_{17b}) ppm.

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 200,80 (C₁₆), 172,10 (C₉), 167,50 (C₁₈), 155,40 (C₁₃), 144,90 (C₄), 144,60 (C₅), 116,00 (C₆), 130,20 (C₁), 120,80 (C₂), 116,70 (C₃), 107,50 (C₁₂), 71,40 (C₁₄), 65,80 (C₈), 54,70 (C₁₅), 51,40 (C₁₉), 37,50 (C₁₀), 34,90 (C₇), 27,20 (C₁₁), 19,40 (C₁₇) ppm.

1.3. Análises preliminares efetuadas aos azeites

1.3.1. Índice de Acidez

A determinação da acidez no azeite foi realizada recorrendo à pesagem rigorosa de 5,0 g de amostra para um matraz de 100 mL, aos quais se adicionaram 25,0 mL de solução de éter dietílico/etanol para sua dissolução. Após este passo, foram adicionadas algumas gotas de indicador de fenolftaleína (2 g / 100 mL de etanol). Procedeu-se à titulação da mistura com uma solução de hidróxido de sódio 0,05 M (previamente padronizada com solução de ácido clorídrico 0,1000 M).

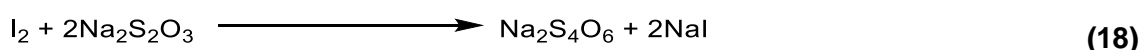
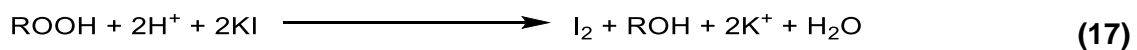
Calculou-se a acidez expressa em ácido oleico de acordo com a equação 16,

$$Acidez = \frac{V \times C \times M}{10 \times m} \quad (16)$$

onde V é o volume, em mL, da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação de cada amostra, C é a concentração da solução de hidróxido de sódio, M é a massa molecular relativa do ácido oleico ($282,4614 \text{ g mol}^{-1}$) e m a massa, em g, de azeite pesado em cada amostra.

1.3.2. Índice de Peróxidos

Para a determinação do índice de peróxidos recorreu-se a uma titulação iodométrica. Este método baseia-se na reação dos hidroperóxidos e outros peróxidos com o ião iodeto em meio ácido, dando origem a iodo, que pode ser titulado com tiosulfato de sódio na presença de amido (equações 17 e 18).



Pesaram-se aproximadamente 0,500 g de azeite para matrizes de 100 mL e adicionaram-se a cada uma das amostras 5,0 mL de solução de ácido acético glacial/clorofórmio (3:1, v/v). Procedeu-se à agitação para dissolução completa das amostras. Adicionaram-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio, agitou-se a mistura e armazenou-se imediatamente ao abrigo da luz durante 1 minuto. No final

desse período de tempo adicionaram-se 10 mL de água desionizada. Procedeu-se à titulação da mistura com solução aquosa de tiosulfato de sódio $1,00 \times 10^{-3}$ M, sob forte e constante agitação, utilizando cozimento de amido como indicador.

O índice de peróxidos (IP) foi calculado recorrendo à equação 19, sendo o seu valor expresso em miliequivalentes de oxigénio por quilograma de azeite.

$$IP = \frac{1000 \times (V - V_0) \times C}{m} \quad (19)$$

onde V é o volume, em mL, da solução padrão de tiosulfato de sódio gasta na titulação de cada amostra, V_0 é o volume, em mL, da solução de tiosulfato de sódio 0,001 M gasta na titulação do branco, C é a concentração em M, da solução de tiosulfato de sódio utilizada na titulação e m é a massa, em g, de azeite pesado em cada amostra.

1.4. Determinação dos compostos fenólicos nos azeites

1.4.1. Obtenção dos fenóis por extração em fase sólida (SPE)

A extração de compostos fenólicos presentes no azeite iniciou-se com a pesagem de 25,0 g de amostra para um matraz de 100 mL, aos quais adicionaram-se 100 μ L de solução metanólica padrão de ácido síngico 0,25 mM. Aguardou-se a evaporação do solvente à temperatura ambiente e dissolveu-se em 60 mL de *n*-hexano. De seguida, transferiu-se a amostra dissolvida em hexano para uma coluna de SPE Discovery® DSC-Diol, da Supelco®, acondicionada previamente com 60,0 mL de metanol, seguidos de 60,0 mL de *n*-hexano. Fez-se passar mais 60,0 mL de *n*-hexano pela coluna.

Extraíram-se os compostos fenólicos retidos na coluna com 150,0 mL de metanol diretamente para um balão de fundo redondo de 250,0 mL e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida a uma temperatura inferior a 30 °C.

Adicionou-se ao extrato fenólico resultante da extração em fase sólida (SPE) 2,50 mL de solução de metanol/água desionizada (1:1, v/v) e 1,0 mL de *n*-hexano e agitou-se no vórtex durante 1 minuto.

Após alguns minutos de repouso para separação das fases, a porção metanólica foi transferida para tubos de microcentrífuga de 2,0 mL e sujeita a uma nova centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se através de um filtro GHP Acrodisc de 13 mm de diâmetro com 0,2 μ m de poro (PALL®) para um *vial* de 2,0 mL.

1.4.2. Obtenção dos fenóis por extração líquido-líquido (Método COI/T.20/Doc No 29/Rev.1 2017)⁶⁹

Procedeu-se à pesagem de aproximadamente 2,0 g de azeite para um tubo Falcon® de 10,0 mL e adicionou-se 1,0 mL de solução metanólica padrão de ácido síngico $7,569 \times 10^{-5}$ M. Agitou-se a amostra no vórtex durante 30 segundos e posteriormente adicionaram-se a esta 5,0 mL de solução de metanol/água (80:20, v/v). A amostra foi novamente agitada no vórtex durante 1 minuto e, terminado esse tempo, colocada em banho de ultrassons à temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugou-se a amostra em tubos Falcon® a 5000 rpm durante 25 minutos e recolheu-se o sobrenadante, filtrando este através de um filtro GHP Acrodisc de 13 mm de diâmetro com 0,2 μm de poro (PALL®) para um *vial* de 2,0 mL.

1.4.3. Determinação de compostos fenólicos presentes nos extratos por UHPLC

Tanto os polifenóis obtidos por SPE como por extração líquido-líquido foram analisados por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) utilizando um cromatógrafo Vanquish® (Thermo Scientific®), uma coluna C18 LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 250 mm x 4 mm (Merck®), acoplados a um detetor UV-Vis de fotódodos (DAD) Vanquish® (Thermo Scientific®) e a uma bomba quaternária Vanquish® (Thermo Scientific®).

Fixaram-se como comprimentos de onda de deteção 280 nm para compostos fenólicos e 335 nm para flavonoides, utilizou-se um volume de injeção de 10 μL e um fluxo de eluição de 1 ml min⁻¹. As amostras foram mantidas a 10 °C até à sua injeção no sistema e foram eluídas a 30 °C, num tempo total de análise de 70 minutos. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de água desionizada/ácido acético (99:1, v/v) (*eluente A*) e uma mistura de metanol/acetonitrilo (1:1, v/v) (*eluente B*), segundo o gradiente da tabela 6.

Tabela 6 - Gradiente de eluentes utilizados para determinação de compostos fenólicos individuais por UHPLC.

Tempo / min	Eluente A (%)	Eluente B (%)
ETAPA DE EQUILÍBRIO		
10	95	5
CORRIDA		
0	95	5
25	70	30
35	65	35
40	60	40
50	30	70
55	0	100
70	0	100

Os diferentes compostos fenólicos presentes no extrato foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os tempos de retenção obtidos para soluções padrão contendo os mesmos compostos

A quantificação dos vários polifenóis foi efetuada a partir de retas padrão obtidas com os compostos fenólicos obtidos comercialmente ou com os obtidos a partir das folhas de oliveira. Para o efeito, efetuaram-se retas de calibração para os seguintes compostos: HyTy, Ty, HyTyAc, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e Oleuropeína. A quantificação dos secoiridóides derivados do tirosol foi efetuada utilizando a reta de calibração do Ty. A quantificação de outros secoiridóides derivados do HyTy foi efetuada utilizando a reta de calibração da oleuropeína.

1.5. Determinação de α -Tocoferol e de γ -Tocoferol presentes no azeite por UHPLC⁷⁰

De modo a proceder à determinação de α -tocoferol e de γ -tocoferol presentes no azeite pesaram-se 0,500 g de azeite para um tubo Falcon® de 10,0 mL e dissolveram-se com 5 mL de isopropanol, agitando-se vigorosamente. Filtraram-se aproximadamente 2,0 mL do azeite dissolvido por um filtro GHP Acrodisc de 13 mm de diâmetro e 0,2 μ m de poro (PALL®) para um *vial* de 2,0 mL.

Analizou-se a amostra por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC), utilizando um cromatógrafo Vanquish® (Thermo Scientific®), uma coluna C18

LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 250 mm x 4 mm (Merck®), acoplados a um detetor UV-Vis de fotodíodos (DAD) Vanquish® (Thermo Scientific®) e a uma bomba quaternária Vanquish® (Thermo Scientific®).

Nas condições cromatográficas estabeleceu-se um comprimento de onda de deteção de 292 nm e um volume de injeção de 10 µL. O fluxo de eluição foi de 1 mL min⁻¹. Mantiveram-se as amostras a 30 °C até à sua injeção no sistema, eluindo-se à mesma temperatura, num tempo total de análise de 20 minutos. Como fase móvel foi utilizado metanol (*eluente A*) e acetonitrilo (*eluente B*), segundo o gradiente registado na tabela 7.

Tabela 7 - Gradiente de eluentes utilizados para determinação de α-tocoferol por UHPLC.

Tempo / min	Eluente A (%)	Eluente B (%)
ETAPA DE EQUILÍBRIO		
10	50	50
CORRIDA		
0	50	50
20	50	50

A identificação cromatográfica do α-tocoferol e do γ-tocoferol foi feita por comparação com o tempo de retenção de uma solução padrão contendo α-tocoferol padrão e de uma outra contendo γ-tocoferol e quantificaram-se estes a partir de retas de calibração efetuada com este mesmo α-tocoferol e γ-tocoferol padrão.

1.5.1. Validação do Método

Com o intuito de avaliar se o método utilizado era eficaz na extração do α-tocoferol, foi preparada uma série de amostras segundo o método de adição de padrão, sendo estas posteriormente analisadas por UHPLC.

Para tal, pesaram-se 5 amostras distintas em tubos Falcon® de 10,0 mL e dissolveram-se com 5 mL de isopropanol, agitando-se vigorosamente. A estas amostras foram adicionadas alíquotas de 50, 100, 150, 200 e 300 µL de uma solução *stock* de α-tocoferol com a concentração de 0,00385 M. Adicionou-se isopropanol de modo a completar os 5,0 mL de solvente e agitaram-se os tubos vigorosamente para dissolução da amostra. Filtrou-se aproximadamente 2,0 mL desta solução por um filtro GHP

Acrodisc de 13 mm de diâmetro e 0,2 µm de poro para um *vial* de 2,0 mL. Cada amostra foi analisada por UHPLC segundo as condições cromatográficas constantes na secção 1.5.

1.6. Determinação da Composição em Ácidos Gordos do Azeite

A determinação da composição em ácidos gordos foi efetuada após a obtenção dos seus ésteres metílicos (FAMEs) por transesterificação com metanol (*figura 17*).

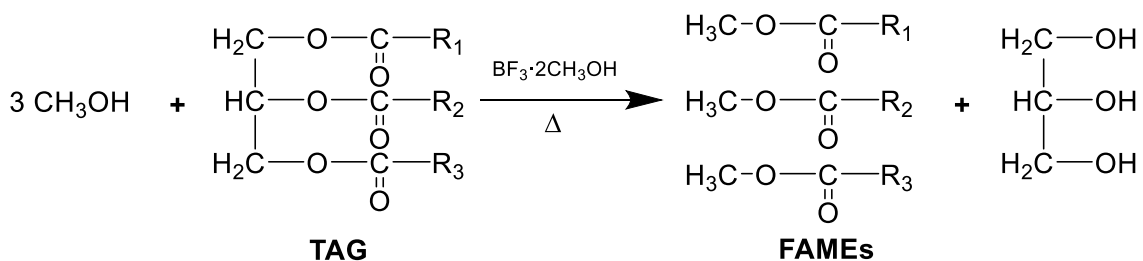


Figura 17 - Reação de formação de FAMEs por transesterificação dos ácidos gordos.

Para o efeito, pesaram-se entre 150 e 200 mg de cada uma das amostras para um tudo de hidrólise e adicionou-se, de seguida, 1,0 mL de metanol e 2,0 mL de solução de trifluoreto de boro em metanol. Agitou-se o tubo para dissolução da amostra, fechou-se e colocou-se em banho-maria à ebulição durante 10 minutos.

Arrefeceu-se em gelo o tubo de hidrólise contendo a mistura e adicionaram-se 5,0 mL de éter etílico. Transferiu-se a mistura para um funil de separação de 100 mL e lavou-se duas vezes com solução saturada de cloreto de sódio (salmoura) e uma vez com água desionizada. Transferiu-se a fase etérea para um frasco de vidro, secou-se com sulfato de sódio anidro e armazenou-se a -20 °C até à sua análise.

Analisaram-se os FAMEs por cromatografia gasosa com deteção de ionização de chama (GC-FID), utilizando-se uma coluna DB Wax, 30 m x 0,53 mm i.d. x 1 µm, um fluxo de azoto de 10 mL min⁻¹ e o detetor a 205 °C. Utilizou-se o seguinte programa de temperatura: 110 °C durante 5 minutos, aumentando, de seguida, para 200 °C a uma velocidade de 3 °C min⁻¹. O volume de injeção foi de 1 µL.

A identificação dos diferentes ácidos gordos foi efetuada por comparação dos tempos de retenção dos picos dos FAMEs provenientes das amostras com os dos picos de soluções padrão.

IV. Resultados e Discussão

1. Análises preliminares efetuadas aos azeites

Antes de se proceder à análise dos antioxidantes nos azeites, determinaram-se os valores de acidez e de índice de peróxidos nas amostras recebidas, de modo a verificar as boas condições das mesmas. Sendo as amostras de azeite virgem extra recentes, esperavam-se valores de acidez e de índice de peróxidos muito baixos (idealmente inferiores a 0,3% e 10, respetivamente), a não ser que tenham ocorrido acidentes durante a extração, o armazenamento ou o transporte das mesmas.

1.1. Índice de Acidez

Os valores de acidez, em percentagem de ácido oleico, das amostras com diferentes índices de maturação, encontram-se registados na figura 18, agrupados por variedade.

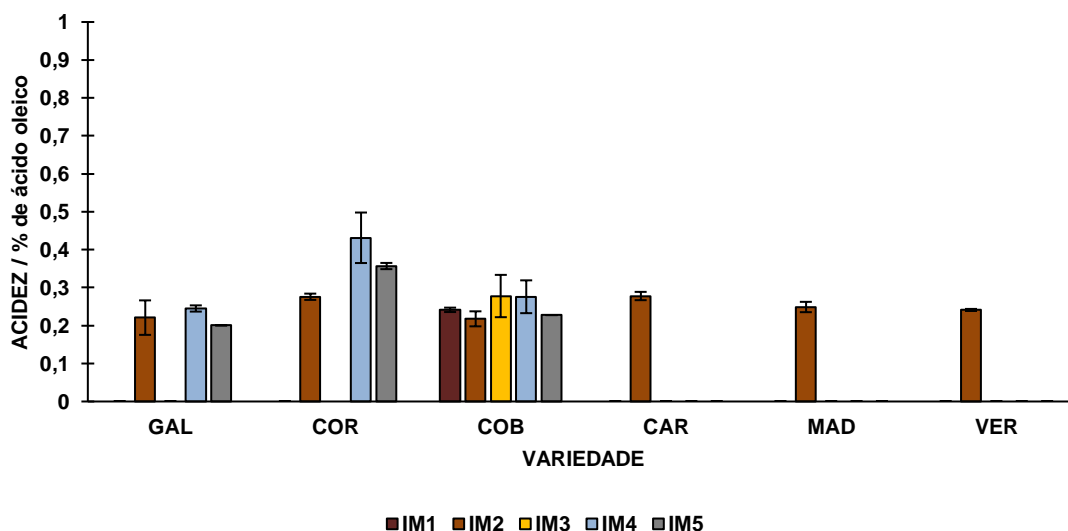


Figura 18 - Valor de acidez das amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasqueira; MAD – madural; VER – verdeal).

Como é possível observar, todas as amostras mostram uma média de índice de acidez característico de azeites virgem extra novos de grande qualidade, possuindo a maioria deles acidez tão baixa quanto 0,2%.

O valor mais alto foi de cerca de 0,4% para as amostras da variedade Cordovil (COR) de estados de maturação mais avançados (IM₄). Segundo os dados do produtor desta variedade, deveria ter resultado num azeite com uma acidez de 0,2%, sendo o aumento deste valor influenciado pelo estado de maturação avançado.⁷¹ Todavia, o valor obtido encontra-se muito abaixo do limite permitido por lei (0,80%), pelo que se considera que todas as amostras estavam num bom estado de conservação.

1.2. Índice de Peróxidos

De modo a avaliar a extensão da oxidação das amostras de azeite, foi determinado o índice de peróxidos de cada uma delas. Desta forma, foi possível verificar se as amostras se encontravam dentro do valor permitido por lei para consumo e também verificar se alguma delas apresentava uma degradação oxidativa superior que compromettesse as restantes análises.

Os valores médios do índice de peróxidos, em miliequivalentes de oxigénio por quilograma de amostra ($\text{mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$) e respetivos desvios-padrão estão apresentados na figura 19, agrupados por variedade (seis no total) e para os diferentes índices de maturação.

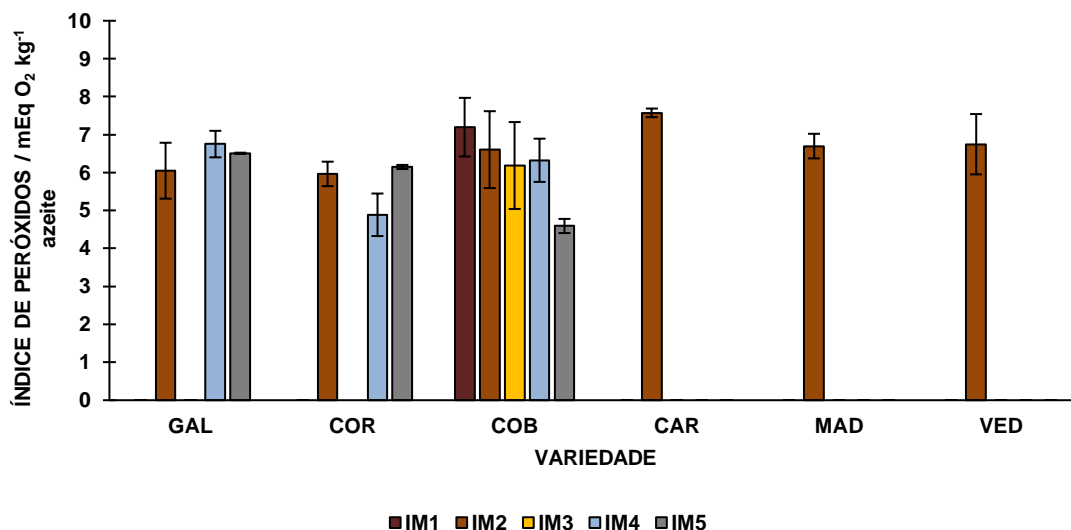


Figura 19 - Índice de peróxidos das amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasqueira; MAD – madural; VER – verdeal).

Mais uma vez, é possível verificar que todas as amostras analisadas apresentavam um índice de peróxidos muito abaixo do limite permitido por lei ($<20 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$), variando entre 5 e $7,5 \text{ mEq O}_2 \text{ kg}^{-1}$, de acordo com o esperado para azeites extra virgem de qualidade.

Verificou-se assim, que todas as amostras recebidas encontravam-se em boas condições para o início do estudo.

2. Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite

2.1. Compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos presentes nos azeites monovarietais em estudo foram inicialmente isolados compostos a partir de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) dado o seu elevado custo no mercado. Para tal foram extraídos e purificados três fenóis utilizados posteriormente como padrões na determinação dos mesmos do azeite: oleuropeína, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA.

No caso da extração da oleuropeína, partiu-se de uma massa de folhas de aproximadamente 120 g, conseguindo obter no final, um extrato de aproximadamente 0,0552 g de composto puro, confirmado por ¹H RMN e UHPLC.

No que toca ao 3,4-DHPEA-EDA e ao 3,4-DHPEA-EA, iniciou-se a extração com aproximadamente 350 g de folhas, sendo que, no final, obtiveram-se 0,1973 g de uma mistura dos dois compostos facilmente purificados.

2.2. Obtenção das retas de calibração

A determinação de compostos fenólicos individuais presentes no azeite foi feita recorrendo à análise por UHPLC de extratos obtidos por dois métodos diferentes: extração por fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (Método COI/T.20/Doc No 29/Rev.1 2017).

Para a quantificação dos diferentes polifenóis recorreu-se a retas padrão obtidas com os compostos fenólicos existentes comercialmente ou com os obtidos a partir das folhas de oliveira. Assim sendo, efetuaram-se retas de calibração para os seguintes compostos: HyTy, Ty, HyTyAc, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e Oleuropeína (*figuras 20 a 25 e tabelas 8 a 13*).

- Hidroxitirosol (HyTy)

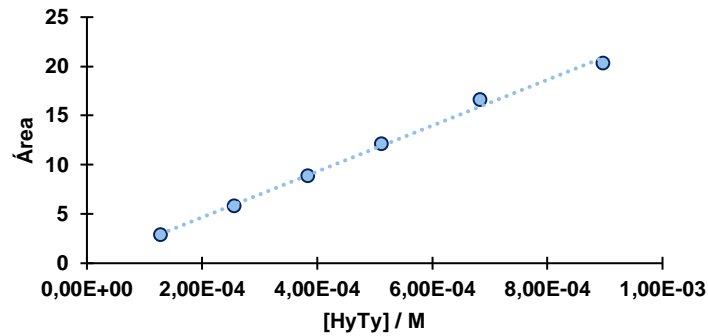


Figura 20 - Área do pico em função da concentração de HyTy e respetiva regressão linear.

Tabela 8 - Regressão linear da reta padrão do HyTy.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
Hidroxitirosol	23,3 x 10 ³	0	0,9995

- Tirosol (Ty)

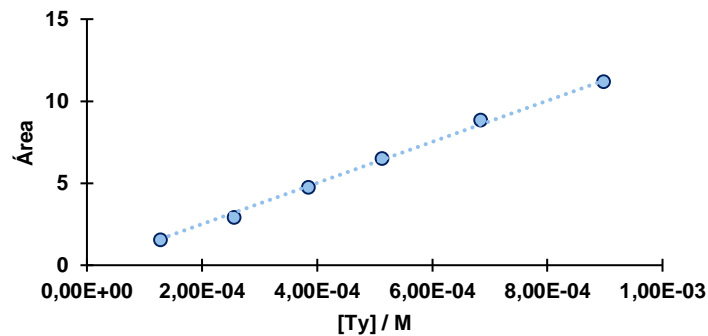


Figura 21 - Área do pico em função da concentração de Ty e respetiva regressão linear.

Tabela 9 - Regressão linear da reta padrão do Ty.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
Tirosol	12,5 x 10 ³	0	0,9997

- **Acetato de Hidroxitirosol (HyTyAc)**

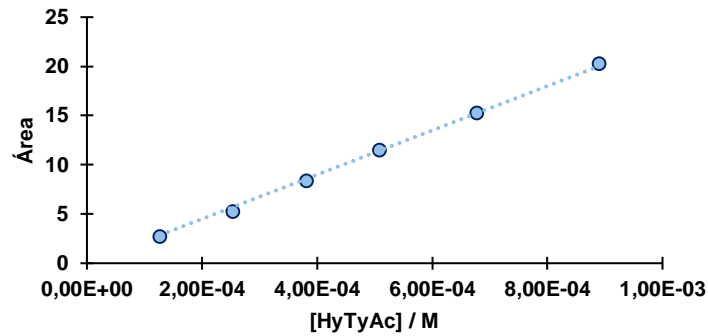


Figura 22 - Área do pico em função da concentração de HyTyAc e respetiva regressão linear.

Tabela 10 - Regressão linear da reta padrão do HyTyAc.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
Acetato de Hidroxitirosol	22,5 x 10 ³	0	0,9996

- **Oleuropeína**

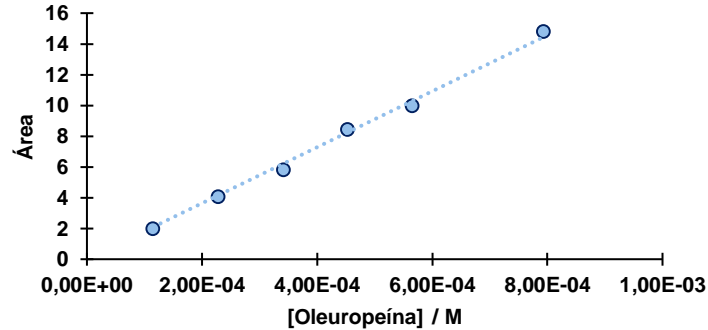


Figura 23 - Área do pico em função da concentração de Oleuropeína e respetiva regressão linear.

Tabela 11 - Regressão linear da reta padrão da Oleuropeína.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
Oleuropeína	18,2 x 10 ³	0	0,9995

- **3,4-DHPEA-EDA**

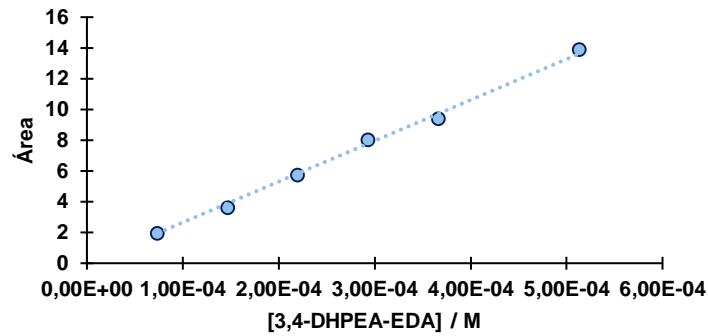


Figura 24 - Área do pico em função da concentração de 3,4-DHPEA-EDA e respetiva regressão linear.

Tabela 12 - Regressão linear da reta padrão do 3,4-DHPEA-EDA.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
3,4-DHPEA-EDA	26,6 x 10 ³	0	0,9995

- **3,4-DHPEA-EA**

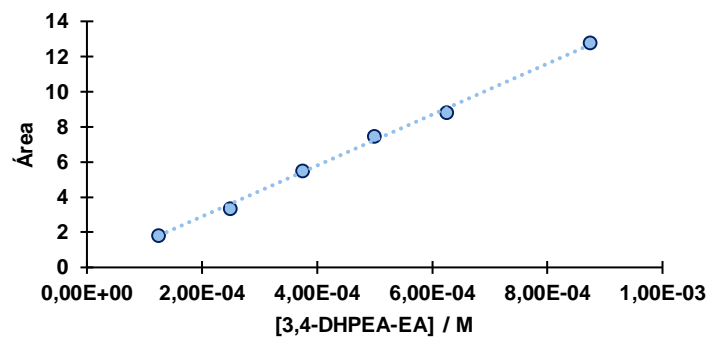


Figura 25 - Área do pico em função da concentração de 3,4-DHPEA-EA e respetiva regressão linear.

Tabela 13 - Regressão linear da reta padrão do 3,4-DHPEA-EA.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
3,4-DHPEA-EA	14,5 x 10 ³	0	0,9997

2.3. Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite extraídos por Extração Líquido-Líquido (Método COI/T.20/Doc No 29/Rev.1 2017)

2.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais presentes no azeite

Efetuuou-se o isolamento dos fenóis do azeite por extração líquido-líquido de acordo com o método aconselhado pelo Conselho Oleícola Internacional (COI).

A análise por UHPLC destes extratos permitiu uma análise pormenorizada dos diferentes compostos constituintes dos extratos obtidos.

Identificaram-se com precisão cinco compostos fenólicos por comparação com padrões previamente injetados: hidroxitirosol (HyTy), tirosol (Ty), acetato de hidroxitirosol (HyTyAc), 3,4-DHPEA-EDA (HyTy-EDA) e 3,4-DHPEA-EA (HyTy-EA) (figuras 26 a 28).

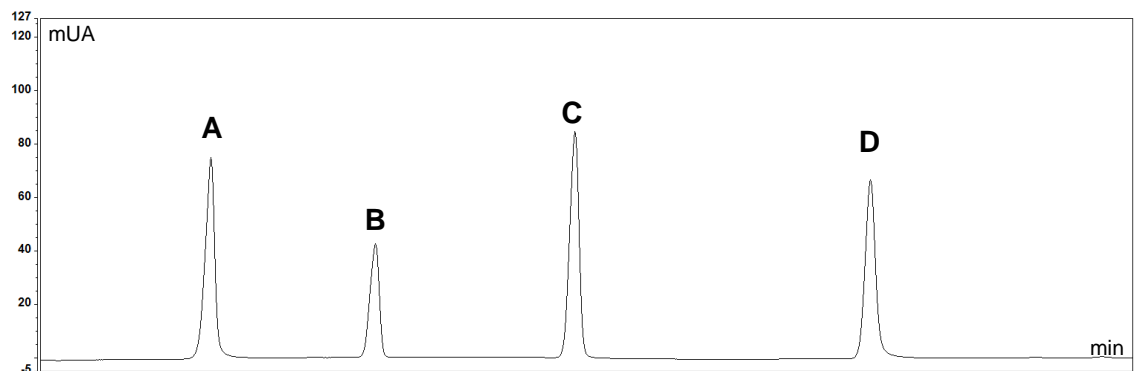


Figura 26 - Cromatograma obtido por UHPLC com os respetivos picos do HyTy (A), Ty (B), Ácido Siringico (C) e HyTyAc (D).

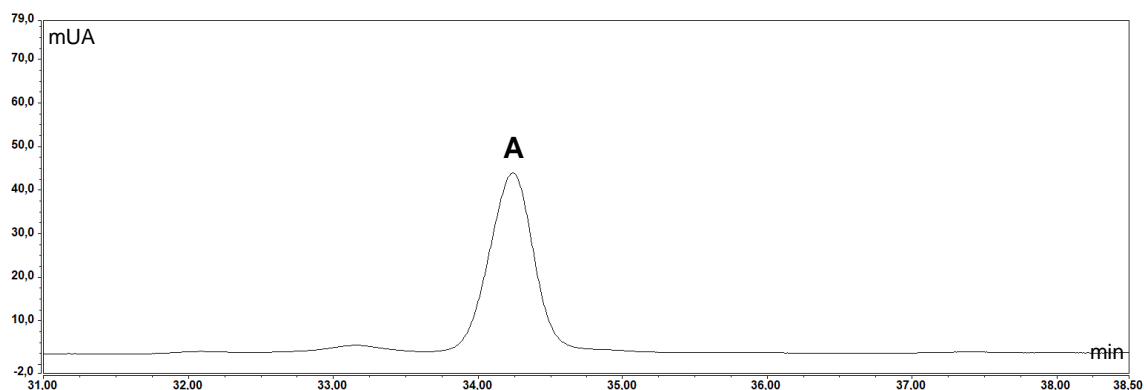


Figura 27 - Cromatograma obtido por UHPLC com o respetivo pico da Oleuropeína (A).

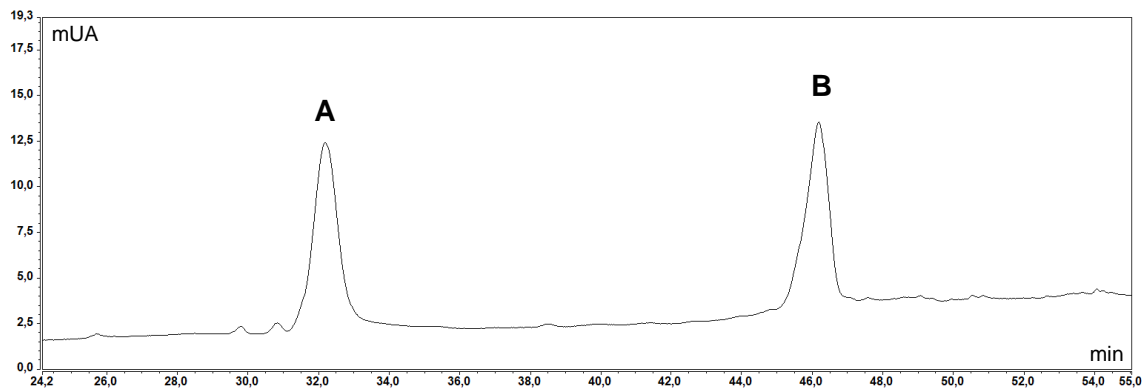


Figura 28 - Cromatograma obtido por UHPLC com os respetivos picos do 3,4-DHPEA-EDA (A) e do 3,4-DHPEA-EA (B).

Efetuuou-se a identificação do pinoresinol (Py), acetoxipinoresinol (PyAc), oleocantal (*p*-HPEA-EDA) (Ty-EDA), do acetato de tirosol (TyAc) e do Ty-EA por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção descritos na literatura.³⁶

A partir das retas de calibração obtidas previamente, efetuou-se a quantificação dos vários fenóis (*figura 29*). No caso dos compostos derivados do hidroxitirosol para os quais não existiam padrões, utilizou-se a reta do HyTy para a sua quantificação. Para o caso dos derivados do Ty, utilizou-se a reta padrão do Ty.

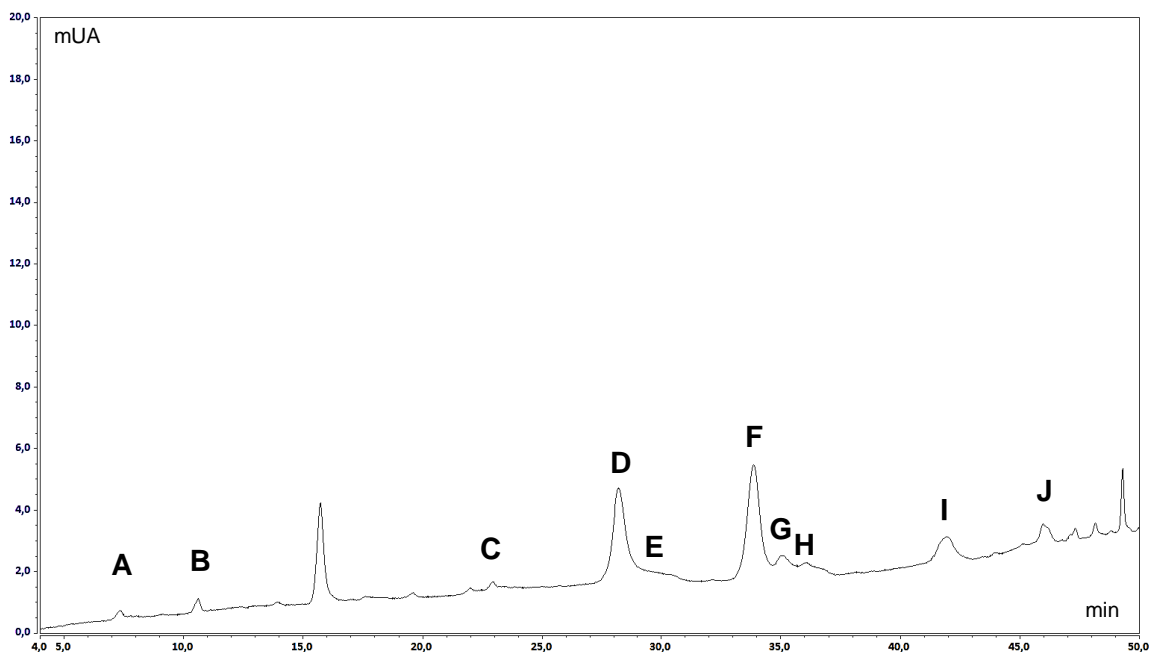


Figura 29 - Cromatograma obtido por UHPLC de um extrato fenólico obtido por extração líquido-líquido a partir de azeite extra virgem. Hidroxitirosol (A); Tirosol (B); Acetato de Hidroxitirosol (C); 3,4-DHPEA-EDA (D); Acetato de Tirosol (E); Oleocantal (F); Pinoresinol (G); Acetoxipinoresinol (H); 3,4-DHPEA-EA (I); *p*-HPEA-EA (J).

A concentração de fenóis totais, em miligramas por cada quilograma de amostra, analisada encontra-se na figura 30.

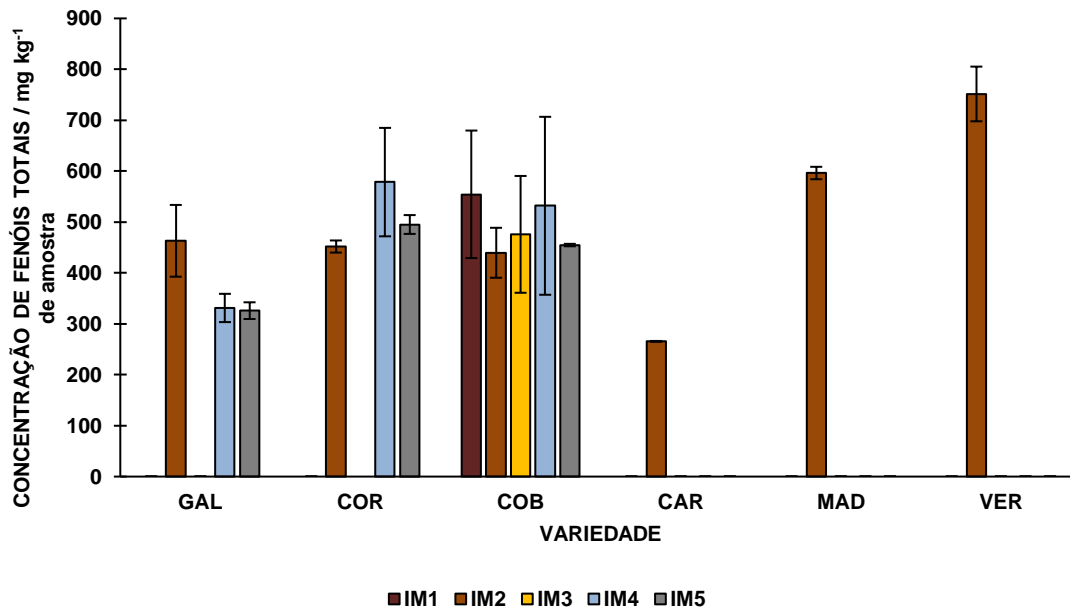


Figura 30 - Concentração de compostos fenólicos presentes em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasquenha; MAD – madural; VER – verdeal).

Analisando os resultados de todas as amostras extraídas por este método, verificou-se que a concentração de fenóis totais oscila entre os $325,95 \pm 16,40$ e os $751,61 \pm 53,72$ mg kg⁻¹ de azeite, dependendo da variedade e do índice de maturação (IM) da amostra. Tendo em conta o mesmo índice de maturação, os valores menores foram verificados para a variedade Carrasquenha (CAR). Já o valor mais alto foi verificado para a variedade Verdeal (VER).

Comparando todas as amostras para o IM₂, verificou-se que efetivamente a variedade Carrasquenha (CAR) originou azeite com um conteúdo em fenóis significativamente menor relativamente às outras variedades. Este facto pode ser uma característica desta variedade, mas uma vez que apenas existiu uma amostra (determinação em duplicado) e não há qualquer informação na literatura sobre o conteúdo em polifenóis desta variedade, tem-se que obter mais amostras desta para confirmar.

O valor elevado encontrado para os azeites monovarietais da variedade Verdeal (VER) está de acordo com o já descrito na literatura por Garcia et al. (2012) que verificou que esta variedade produz azeites com um alto teor de fenóis.⁵⁵ De acordo com Garcia

et al. (2012), o teor fenólico de vários azeites monovarietais portugueses apresentou valores entre os 326 e os 1110 mg kg⁻¹ de azeite, intervalo no qual se inserem grande parte das amostras estudadas, cujo valor máximo de concentração calculado é 751,61±53,72 mg kg⁻¹ de azeite.⁵⁵ No entanto, é de salientar que apenas o azeite monovarietal de Verdeal é comum aos dois estudos e os azeites monovarietais obtidos por Garcia et al. tinham sido extraídos por uma unidade piloto de extração (Abencor). Normalmente, azeites extraídos por estas unidades conseguem preservar melhor os polifenóis do azeite, produzindo azeites muito ricos em fenóis. Já no caso em estudo, as amostras eram de azeites monovarietais embalados prontos para expedição em que o tempo que decorre entre a extração e a embalagem é muito superior ao que acontece numa unidade piloto e, por outro lado, no sistema piloto é também utilizada muito menos água durante a extração, evitando a diluição dos polifenóis nas águas ruças. Assim, espera-se que o conteúdo em polifenóis obtidos por estas unidades seja superior ao encontrado em azeites comerciais. De qualquer modo, é de salientar o elevado conteúdo em polifenóis destes azeites.

Relativamente à variação no conteúdo em fenóis com o índice de maturação, verificou-se que o comportamento variou de acordo com as variedades. Assim, não foram observadas diferenças significativas nos fenóis totais para a variedade Cordovil (COR), bem como para a variedade Cobrançosa (COB) ao longo da maturação. Já os azeites obtidos da variedade Galega (GAL) mostraram uma diminuição significativa do conteúdo em fenóis do IM₂ para o IM₅. Estas observações também se encontram de acordo com o descrito por Garcia et al., em que observou diferentes comportamentos dependendo das variedades, com apenas pequenas oscilações para o conteúdo em fenóis dos azeites provenientes da variedade Carrasqueira (CAR), da variedade Verdeal (VER) e da Bical ao longo dos índices de maturação, mas uma significativa diminuição no caso da Negrucha.⁵⁵

Dado que a concentração de fenóis totais é dada pela soma de todos os fenóis individuais, é provável que o valor não sofra variações consideráveis, uma vez que a possível degradação de determinados fenóis (por exemplo, os secoiridóides), ao longo da maturação, originará outros quantificáveis (por exemplo, álcoois fenólicos), mantendo assim o valor de concentração total parcialmente fixa.

Os dados referentes às amostras processadas pela extração líquido-líquido foram ainda tratados de uma outra forma quanto aos valores de concentração de fenóis totais. De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI), os valores de concentração de fenóis totais deverão ser apresentados em miligramas de tirosol por cada quilograma de azeite (mg Ty kg⁻¹) (figura 31).

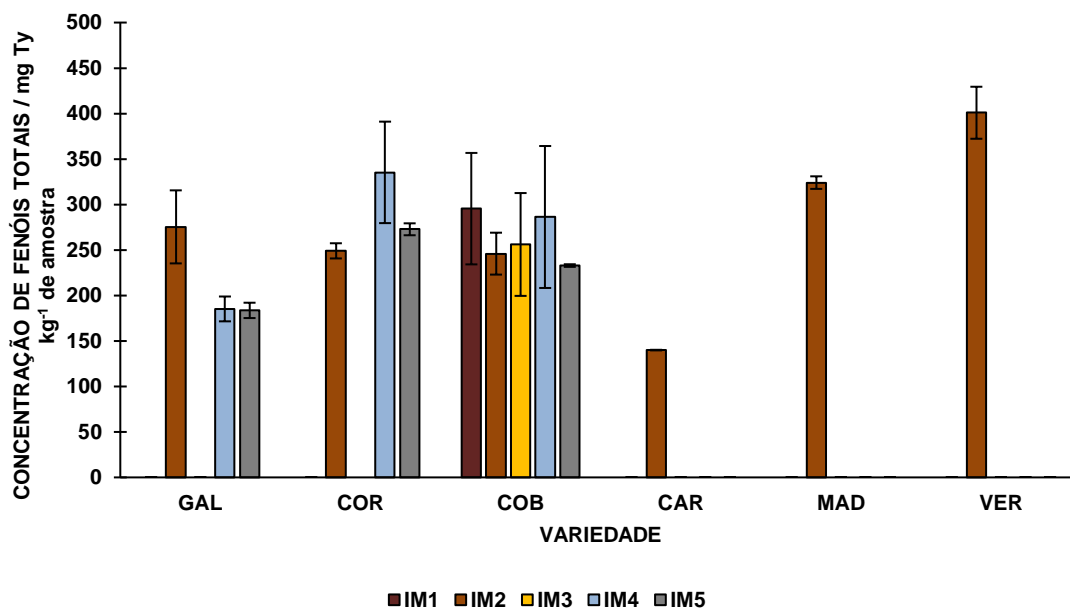


Figura 31 - Concentração de compostos fenólicos presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. Os valores de concentração são apresentados em miligramas de tirosol (Ty) por cada quilograma de amostra. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasquenha; MAD – madural; VER – verdeal).

Quando apresentados em função da massa de tirosol (conforme indicação do COI), os valores de concentração de compostos fenólicos totais no azeite sofrem uma diminuição, uma vez que o tirosol é o polifenol quantificado com a massa molar mais baixa ($M_r = 138,16 \text{ g mol}^{-1}$). Todavia, esta alteração não implica uma discussão divergente da feita anteriormente, pois verifica-se igualmente os valores maiores de concentração para a variedade Verdeal (VER) ($400,84 \pm 28,60 \text{ mg Ty kg}^{-1}$ de azeite) e os menores para a variedade Carrasquenha (CAR) ($139,93 \pm 0,33 \text{ mg Ty kg}^{-1}$ de azeite). É de salientar que, apesar de recomendada, esta representação dos resultados conduz a uma interpretação sempre por defeito dos mesmos, sendo a concentração apresentada sempre mais baixa do que a que efetivamente é real.

2.3.2. Determinação dos compostos fenólicos individuais presentes no azeite

Para além do estudo da concentração total de fenóis no azeite, foi ainda estudada a variação da concentração de cada um dos polifenóis identificados, nas diferentes variedades, para o mesmo índice de maturação (IM_2) (figuras 32 e 33).

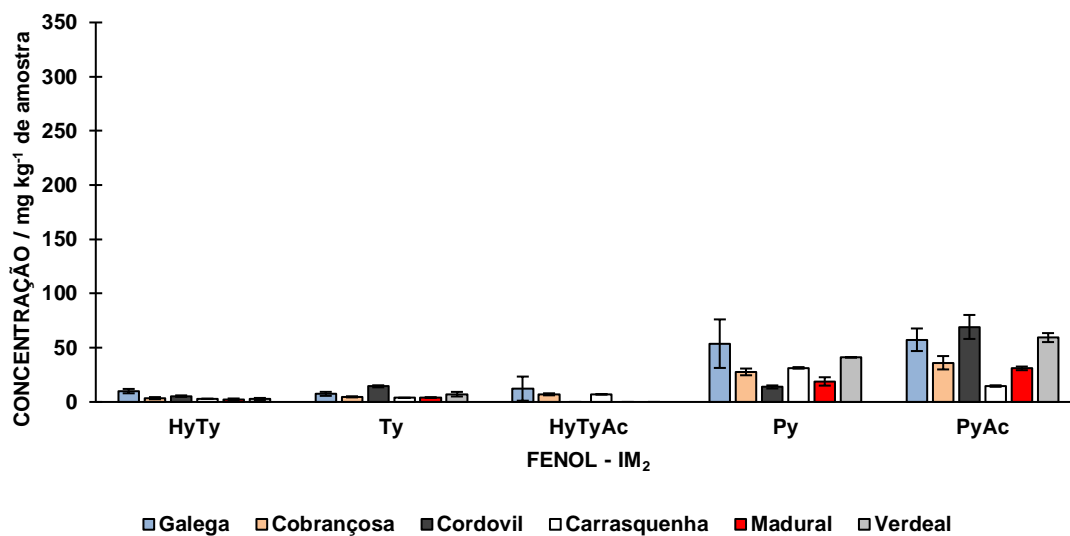


Figura 32 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (HyTy, Ty, HyTyAc, Py e PyAc) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM_2). Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra.

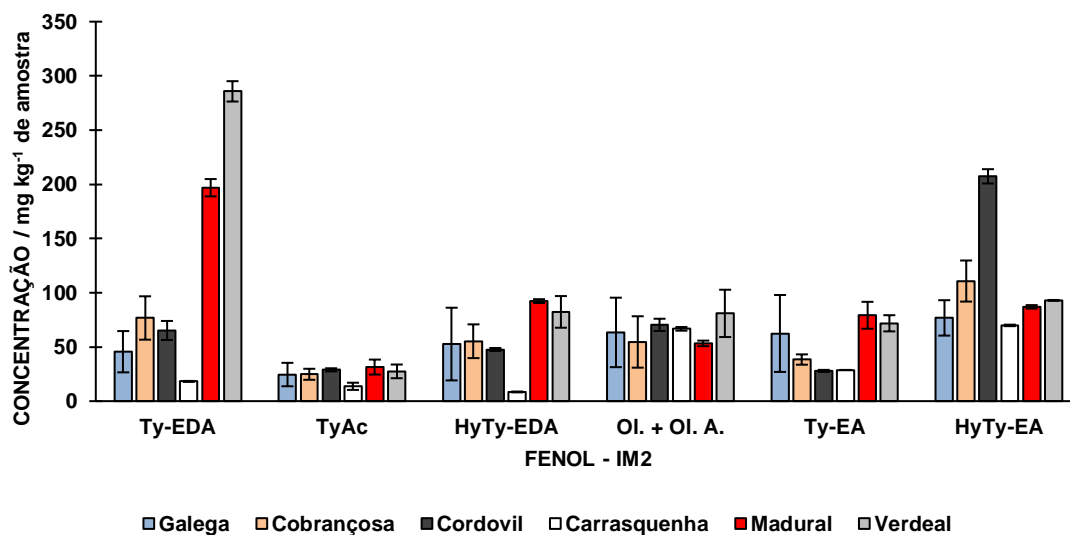


Figura 33 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (Ty-EDA, TyAc, HyTy-EDA, Ol. + Ol. A., Ty-EA e HyTy-EA) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM_2). Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra.

Os azeites monovarietais estudados apresentaram baixos teores em álcoois fenólicos e derivados (HyTy, Ty e HyTyAc) com uma variação entre aproximadamente 3,17 mg kg⁻¹ e os 15 mg kg⁻¹, e altos teores de secoiridóides (Ty-EDA, Ty-EA, HyTy-EDA e HyTy-EA), aproximadamente entre os 28 mg kg⁻¹ e os 207 mg kg⁻¹.

A baixa prevalência de álcoois fenólicos e o elevado teor de secoiridóides pode ser entendido como um fator de qualidade das amostras de azeite, característico de azeites novos, dado que ainda não é significativa a degradação dos secoiridóides que dariam origem aos álcoois fenólicos referidos.

No geral, e embora os azeites monovarietais provenientes das variedades Verdeal (VER), Madural (MAD) e Galega (GAL) apresentem maior conteúdo em HyTy-EDA, todos os azeites monovarietais apresentam quantidades significativas deste secoiridóide. Já relativamente aos outros polifenóis, observa-se uma grande variação no seu conteúdo dependendo da variedade que lhe deu origem. Assim, os azeites monovarietais provenientes de Verdeal (VER) e de Madural (MAR) apresentam elevados conteúdos em HyTy-EA, como referido, e em Ty-EDA, mas apenas a Verdeal (VER) apresenta altos conteúdos em pinosinol (Py). Já os azeites monovarietais provenientes da variedade Galega (GAL) apresentam conteúdos muito baixos em Ty-EDA.

O principal polifenol encontrado no azeite monovarietal de Carrasqueira (CAR) é o HyTy-EA, em quantidades semelhantes ao azeite de Galega (GAL), mas possui quantidades muito pequenas de Ty-EDA e HyTy-EDA. Enquanto que todos os azeites monovarietais apresentaram conteúdos em HyTy-EDA muito semelhantes, este azeite quase que não contém esse polifenol.

O estudo destas diferenças no perfil polifenólico dos vários azeites monovarietais poderá então no futuro permitir distinguir as variedades que lhe deram origem.

2.4. Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite extraídos por Extração por Fase Sólida (SPE)

2.4.1. Determinação dos compostos fenólicos totais presentes no azeite

A extração dos compostos fenólicos por SPE permitiu realizar a determinação detalhada dos diferentes compostos fenólicos que estavam presentes nas diferentes amostras de azeite. A sua análise por UHPLC originou cromatogramas detalhados tais como o da figura 34.

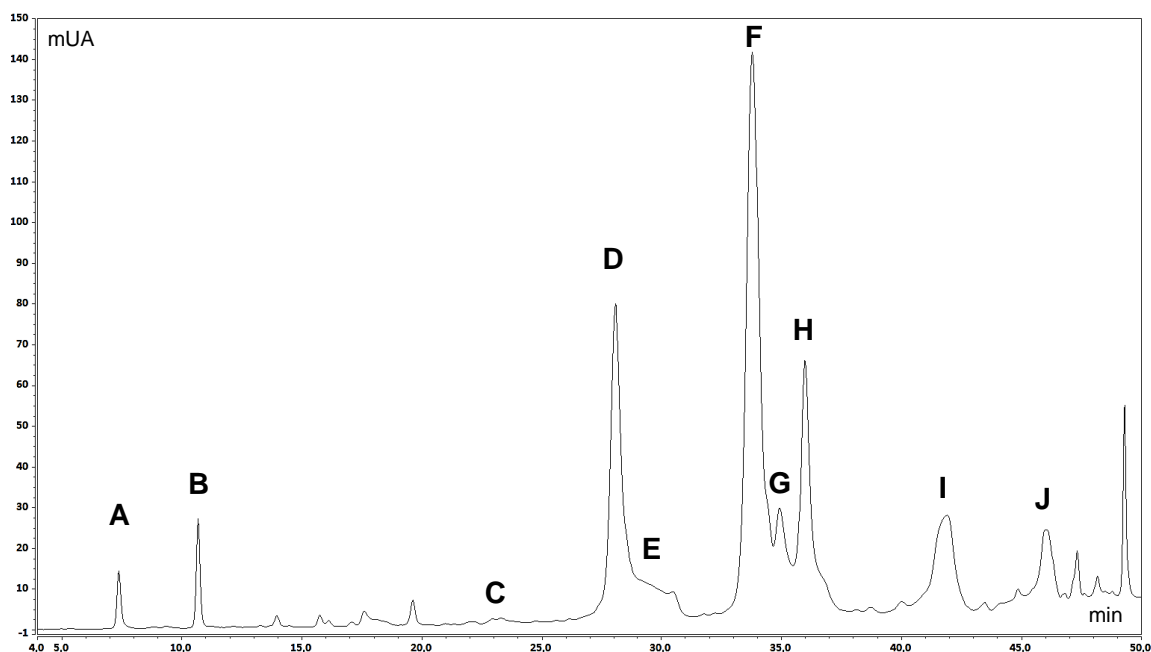


Figura 34 - Cromatograma obtido por UHPLC de um extrato fenólico obtido por extração por fase sólida a partir de azeite extra virgem. Hidroxitirosol (A); Tirosol (B); Acetato de Hidroxitirosol (C); 3,4-DHPEA-EDA (D); Acetato de Tirosol (E); Oleocantal (F); Pinoresinol (G); Acetoxipinoresinol (H); 3,4-DHPEA-EA (I); *p*-HPEA-EA (J).

Nos cromatogramas das amostras provenientes de SPE foi possível identificar, mais uma vez, com precisão cinco compostos fenólicos por comparação com padrões anteriormente injetados: hidroxitirosol (HyTy), tirosol (Ty), acetato de hidroxitirosol (HyTyAc), 3,4-DHPEA-EDA (HyTy-EDA) e 3,4-DHPEA-EA (HyTy-EA).

De acordo com a literatura existente, foi possível ainda a identificação do pinoresinol (Py), acetoxipinoresinol (PyAc), oleocantal (*p*-HPEA-EDA) (Ty-EDA), do acetato de tirosol (TyAc) e do Ty-EA por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção descritos.³⁶

Recorrendo às retas de calibração obtidas previamente, quantificaram-se os vários fenóis (*figura 34*), calculando posteriormente a concentração de fenóis totais (em mg) por cada quilograma de amostra analisada (*figura 35*).

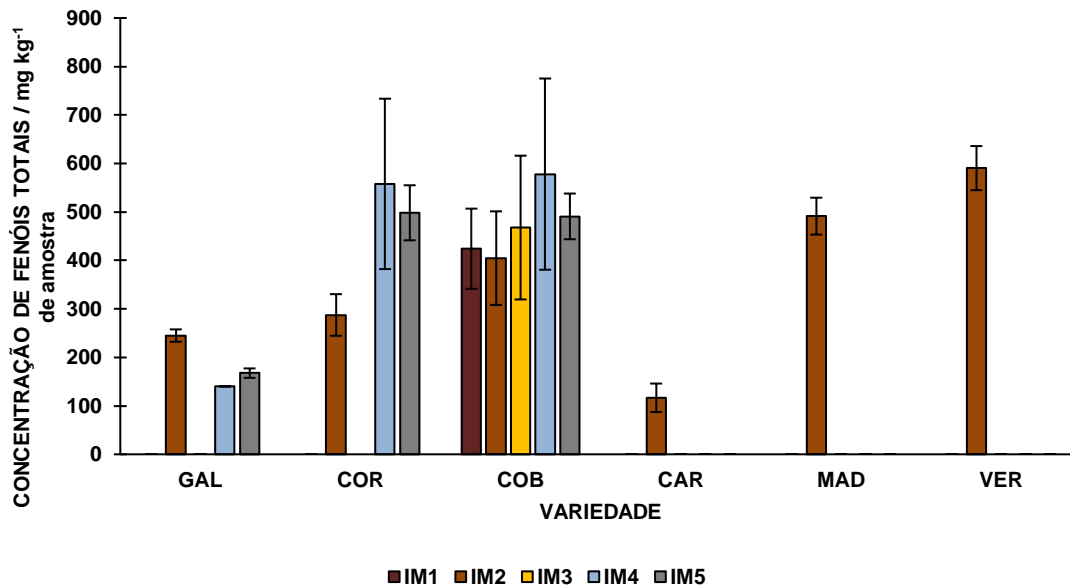


Figura 35 - Concentração de compostos fenólicos presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasquenha; MAD – madural; VER – verdeal).

Pela análise da *figura 35*, verifica-se que os extratos obtidos por extração por fase sólida apresentam uma concentração total de fenóis entre $140,14 \pm 0,70 \text{ mg kg}^{-1}$ e $590,36 \pm 45,48 \text{ mg kg}^{-1}$. Utilizando este método de extração, os azeites monovarietais de Cordovil (COR) são, no geral, aqueles que apresentam os valores mais altos, tendo havido uma diminuição relativa do conteúdo de polifenóis para os azeites de Madural (MAR) e Verdeal (VER), quando comparados com os valores obtidos pelo método de extração líquido-líquido (*figura 30*).

Utilizando este método verifica-se igualmente que o azeite monovarietal de Carrasquenha é o que possui o menor conteúdo em polifenóis.

A variação no conteúdo em polifenóis totais ao longo da maturação para as variedades Galega (GAL), Cordovil (COR) e Cobrançosa (COB) foi semelhante à obtida utilizando a extração líquido-líquido, ou seja, nos azeites monovarietais de Cordovil (COR) e Cobrançosa (COB) não se observam oscilações significativas ao longo do tempo ao contrário do que se observa para a Galega (GAL), que tem uma diminuição significativa do IM₂ para o IM₄ e IM₅.

2.4.2. Determinação dos compostos fenólicos individuais presentes no azeite

Foi ainda feita a análise dos valores de concentração de cada um dos fenóis identificados e a sua variação entre variedades, no mesmo índice de maturação (IM_2) (figuras 36 e 37).

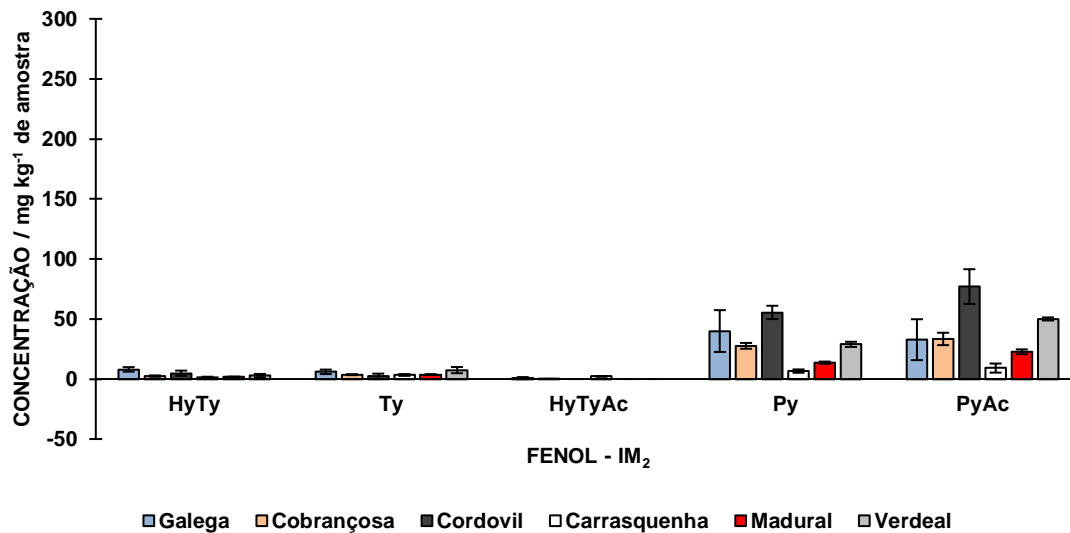


Figura 36 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (HyTy, Ty, HyTyAc, Py e PyAc) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM_2). Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra.

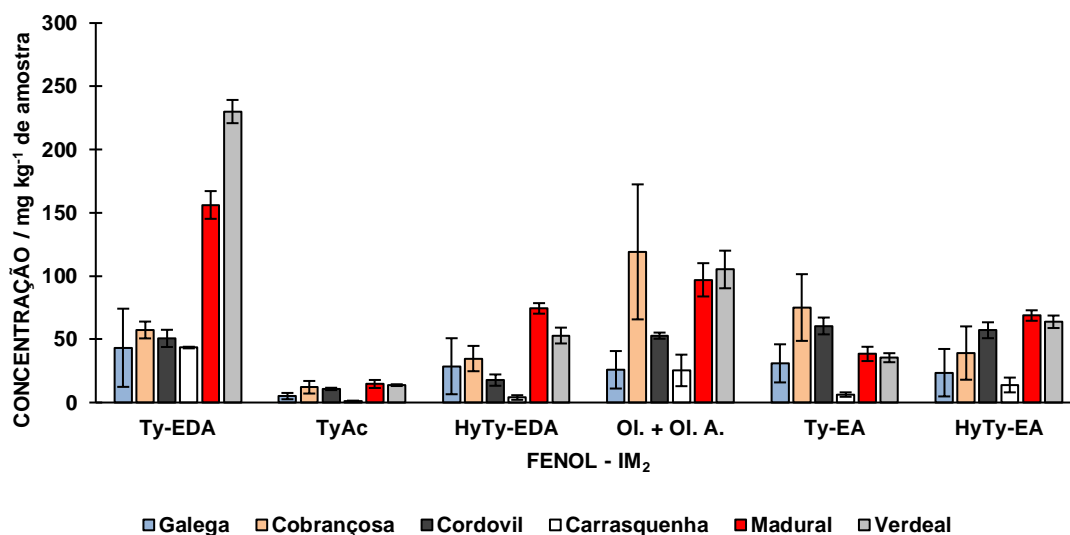


Figura 37 - Concentração de cada um dos compostos fenólicos identificados (Ty-EDA, TyAc, HyTy-EDA, OI. + OI. A., Ty-EA e HyTy-EA) em amostras de azeite de seis variedades diferentes no mesmo estado de maturação (IM_2). Os valores de concentração são apresentados em miligramas de cada composto por cada quilograma de amostra.

Utilizando como método de extração a extração por fase sólida, verifica-se que os extratos fenólicos finais apresentam algumas diferenças relativamente aos obtidos por extração líquido-líquido. Os cromatogramas apresentam uma quantidade superior de picos, sendo este método mais sensível a determinados fenóis não detetados ou separados pelo método de extração líquido-líquido. Todavia, é de referir que a massa de azeite utilizada para este método é aproximadamente 10 vezes superior à do anterior, pelo que os extratos avaliados eram concentrados. No geral, este método de extração mostrou ser adequado à extração de polifenóis mais simples, mas ineficiente na extração dos polifenóis mais complexos pelo que o conteúdo em secoiridóides é subestimado.

3. Determinação de α -tocoferol e de γ -tocoferol presentes no azeite

A determinação de α -tocoferol e de γ -tocoferol presentes nas diferentes amostras de azeite analisadas foi efetuada por UHPLC (*figura 38*), após extração com metanol.

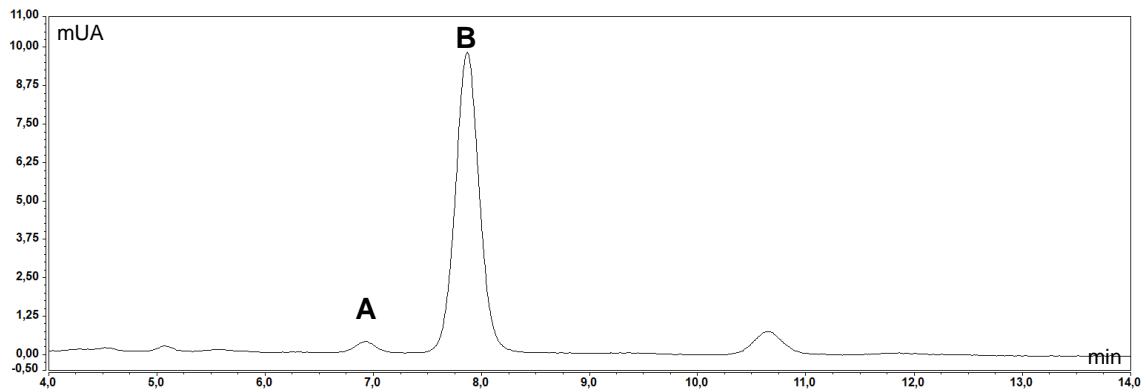


Figura 38 - Cromatograma obtido por UHPLC de amostra de azeite e respetivos pico do γ -tocoferol (A) e do α -tocoferol (B).

Nos cromatogramas obtidos por UHPLC (tais como o da *figura 38*), podem ser identificados um pico principal, com um tempo de retenção de aproximadamente 8,0 minutos, correspondente ao α -tocoferol, antecedido de um com área menos significativa com tempo de retenção de aproximadamente 7,0 minutos, correspondente ao γ -tocoferol. Recorrendo às retas padrão realizadas com padrões (*figura 39*) com diferentes concentrações de α -tocoferol (*figura 40 e tabela 14*) e de γ -tocoferol (*figura 41 e tabela 15*), determinou-se a concentração de cada composto em cada uma das amostras (*figuras 42 e 43*).

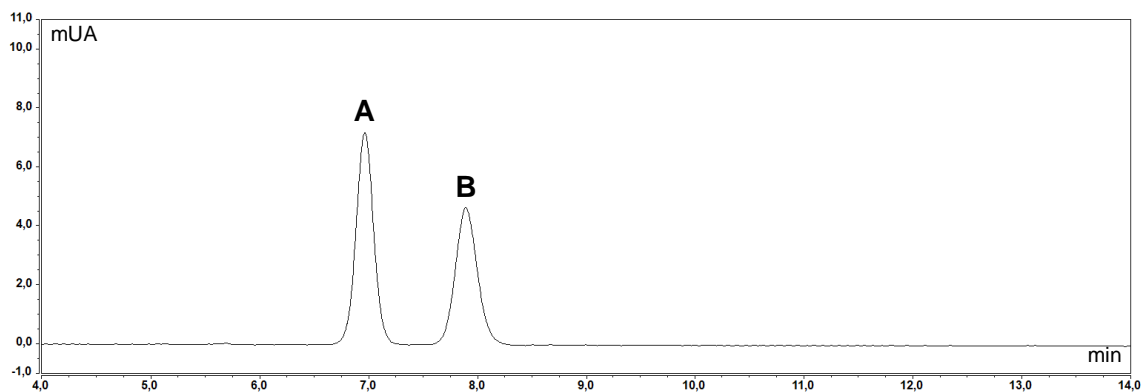


Figura 39 - Cromatograma obtido por UHPLC de uma solução padrão e respetivo pico de γ -tocoferol (A) e α -tocoferol (B).

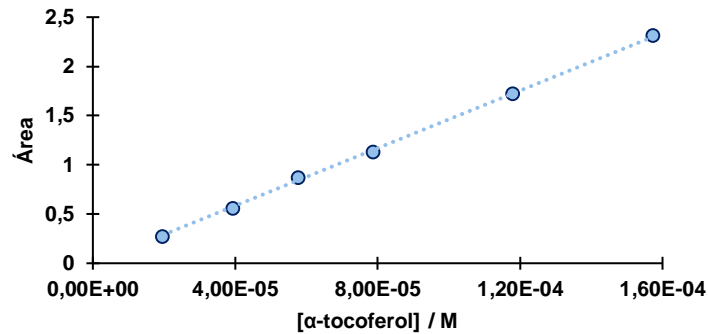


Figura 40 - Área dos picos em função da concentração de α -tocoferol e respetiva regressão linear.

Tabela 14 - Regressão linear da reta padrão do α -tocoferol.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
α -tocoferol	$14,6 \times 10^3$	0	0,9999

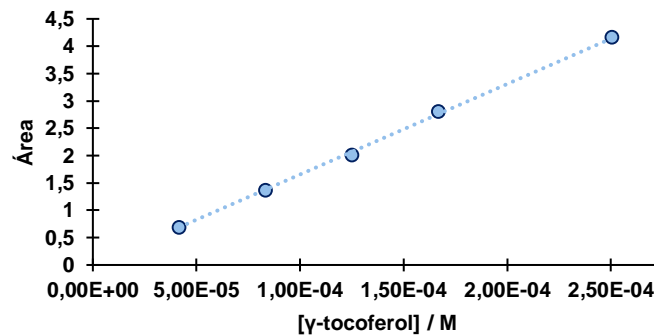


Figura 41 - Área dos picos em função da concentração de γ -tocoferol e respetiva regressão linear.

Tabela 15 - Regressão linear da reta padrão do γ -tocoferol.

Composto	Declive	Ordenada na origem	R ²
γ -tocoferol	$16,5 \times 10^3$	0	0,9998

Os valores médios de concentração de α -tocoferol (figura 42) e de γ -tocoferol (figura 43) (e respetivos desvios-padrão) apresentados para os vários azeites, encontram-se agrupados pelas diferentes variedades e para os vários estados de maturação.

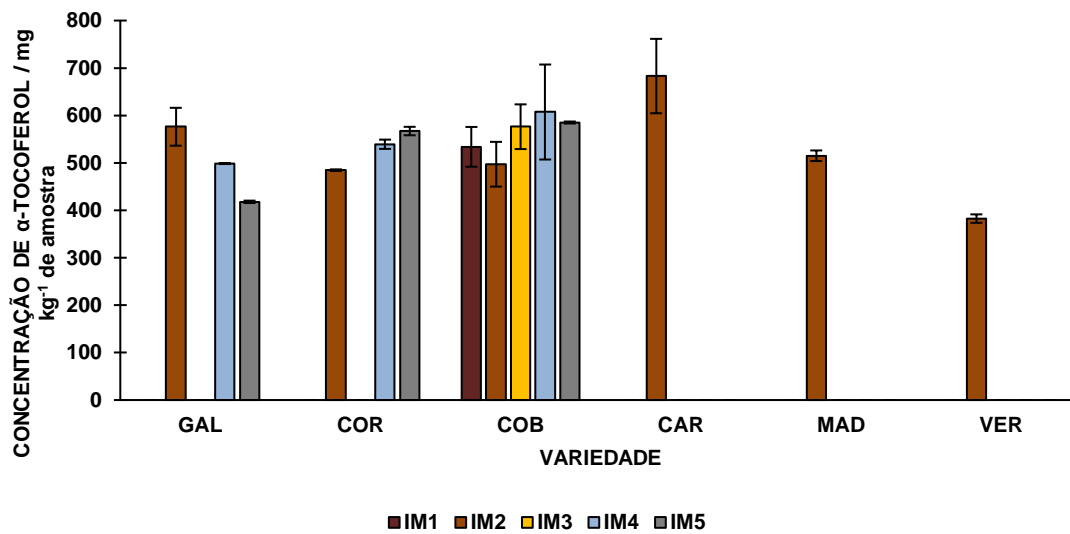


Figura 42 – Concentração de α -tocoferol presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasqueira; MAD – madural; VER – verdeal).

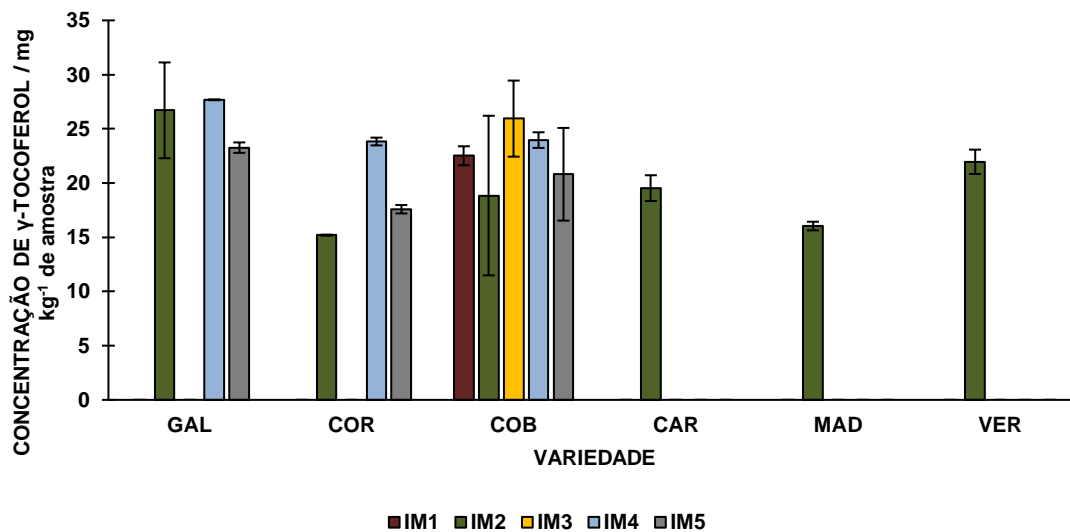


Figura 43 - Concentração de γ -tocoferol presente em amostras de azeite de seis variedades diferentes e respetiva variação com o índice de maturação. (variedades: GAL – galega; COR – cordovil; COB – Cobrançosa; CAR – carrasqueira; MAD – madural; VER – verdeal).

Os valores obtidos de concentração de α -tocoferol para as várias amostras andaram à volta dos 537 ± 73 ppm, enquanto os valores obtidos de concentração de γ -tocoferol apresentaram-se numa média de $22,5 \pm 4,5$ ppm.

Para o mesmo índice de maturação (IM_2), as diferentes variedades analisadas apresentam aproximadamente o mesmo teor de α -tocoferol, não se registando

variações significativas entre as diferentes variedades, embora as amostras do azeite monovarietal de Verdeal (VER) tenham mostrado conteúdo em α -tocoferol significativamente menor que todas as outras variedades no mesmo estado de maturação. No que toca ao conteúdo em γ -tocoferol, para o mesmo índice de maturação, registam-se variações, sendo as amostras de azeite monovarietal de Cordovil (COR) são as que apresentam o menor valor e as amostras de azeite monovarietal de Galega (GAL) as que apresentam os maiores valores.

Curiosamente, o azeite que apresentou o maior conteúdo em α -tocoferol foi extraído da variedade Carrasqueira (CAR), provavelmente como forma de compensar o mais baixo conteúdo em polifenóis apresentado. No entanto, como já referido, será necessário o estudo de mais azeites monovarietais de Carrasqueira (CAR) para confirmar o perfil em antioxidantes muito particular desta variedade.

Ao longo da maturação, foram observados comportamentos diferentes do conteúdo em α -tocoferol e em γ -tocoferol para três dos azeites monovarietais estudados.

Nas variedades Cordovil (COR) e Cobrançosa (COB), é possível verificar que não houve alterações significativas na concentração em α -tocoferol ao longo da maturação. Contudo, apenas a variedade Cobrançosa (COB) não regista variações no teor em γ -tocoferol ao longo dos diferentes índices de maturação. Na variedade Cordovil (COR) é notório um decréscimo do teor em γ -tocoferol com o avançar da maturação do fruto. Na variedade Galega (GAL), nos três índices de maturação fornecidos (IM₂, IM₄ e IM₅), é possível verificar um decréscimo de aproximadamente 25% na concentração do α -tocoferol com o aumento do índice de maturação. Deste modo, as alterações na concentração em α -tocoferol ao longo da maturação mostrou ser dependente da variedade estudada. O mesmo se verifica para a concentração em γ -tocoferol.

Em azeites monovarietais obtidos muito prematuramente, a partir de azeitona colhida em fim de setembro e início de outubro, observaram-se valores em α -tocoferol muito elevados (até 500 ppm).⁵⁵ No entanto, estes valores diminuem drasticamente a partir de finais de outubro para valores abaixo dos 200 ppm.² Assim, é de salientar que os valores obtidos para a concentração de α -tocoferol são significativamente superiores aos encontrados até então em estudos semelhantes na literatura, sendo que, no entanto, os valores de concentração de γ -tocoferol se encontram dentro do esperado para estes azeites.

4. Determinação da Composição em Ácidos Gordos

Efetou-se a identificação dos vários FAMES recorrendo a vários padrões previamente obtidos (*figura 44*).

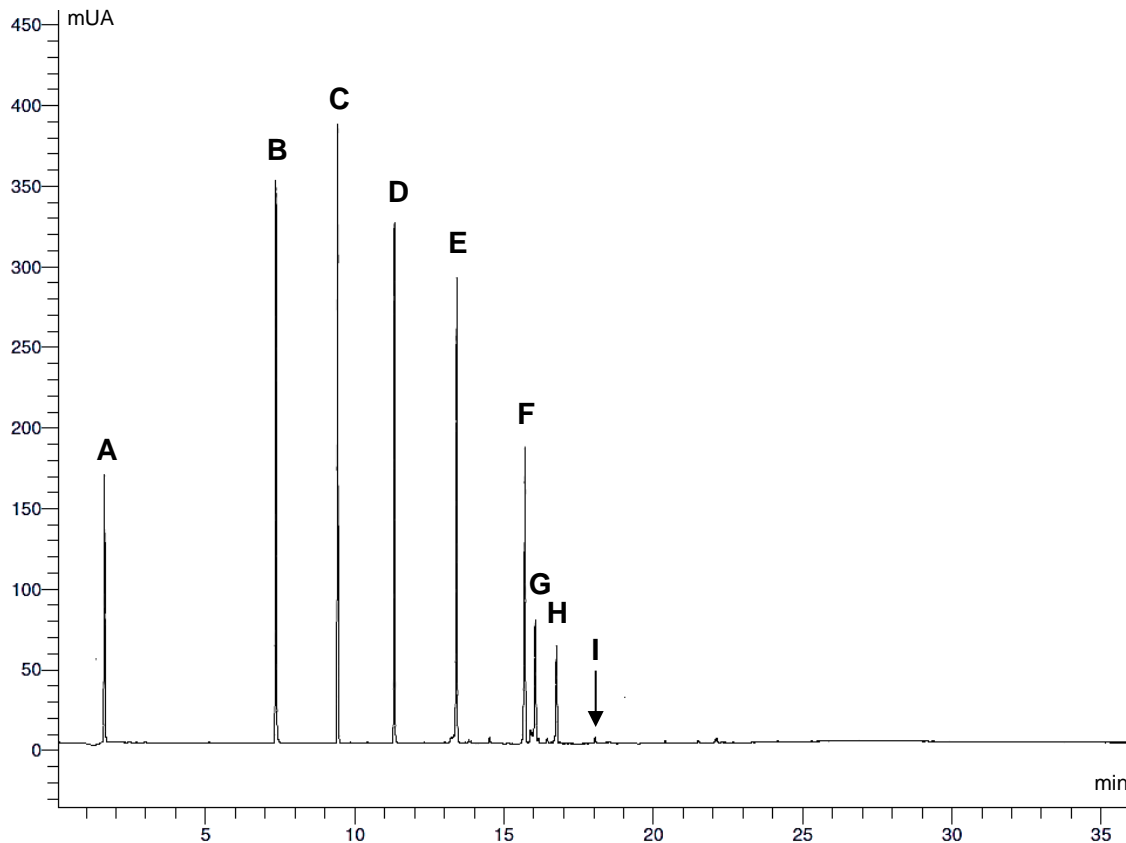


Figura 44 - Cromatograma obtido por GC-FID com os respetivos picos dos FAMES característicos do Ácido Butírico – C4:0 (A), Ácido Cáprico – C10:0 (B), Ácido Láurico – C12:0 (C), Ácido Mirístico – C14:0 (D), Ácido Palmítico – C16:0 (E), Ácido Esteárico – C18:0 (F), Ácido Oleico – C18:1 (G), Ácido Linoleico – C18:2 (H) e Ácido Linolénico – C18:3 (I)

Após a obtenção dos FAMES, o perfil em ácidos gordos nas diferentes amostras de azeite foi determinado por GC-FID, obtendo-se cromatogramas tais como os da *figura 45*.

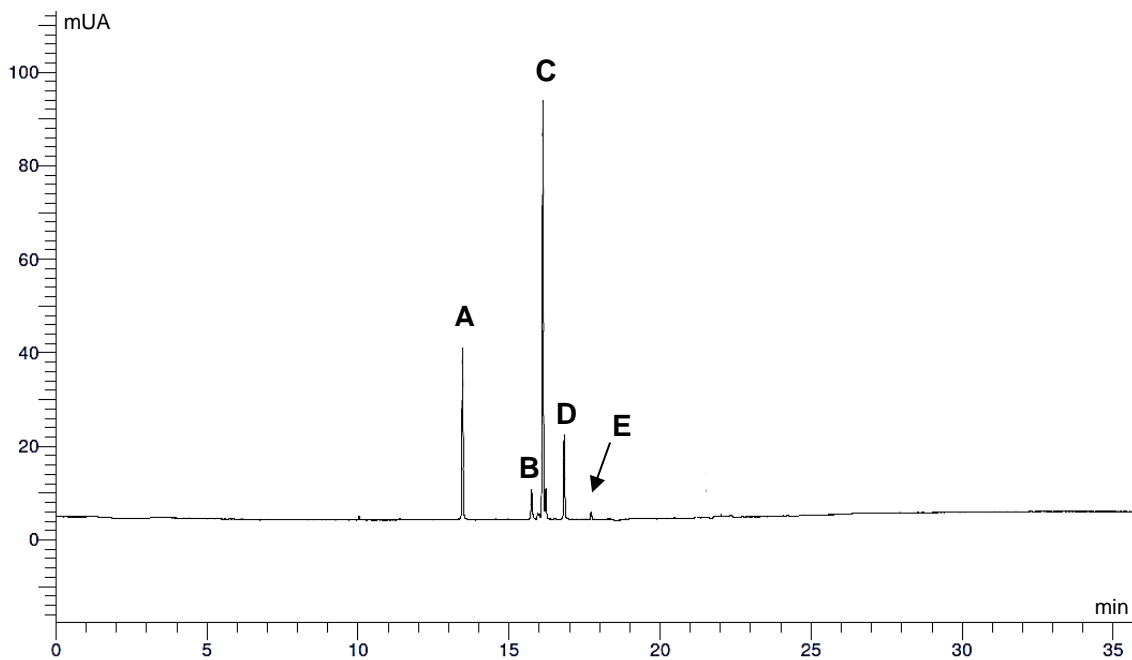


Figura 45 - Cromatograma obtido por GC-FID de uma amostra de FAMES de azeite extra virgem contendo Ácido Palmítico – C16:0 (A), Ácido Esteárico – C18:0 (B), Ácido Oleico – C18:1 (C), Ácido Linoleico – C18:2 (D) e Ácido Linolénico – C18:3 (E).

Analisando os perfis cromatográficos das diferentes amostras, é possível detetar semelhanças significativas em todos eles, sendo detetáveis e quantificáveis os ésteres metílicos dos quatro ácidos gordos que ocorrem em maior quantidade no azeite – o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2) – bem como um outro minoritário – o ácido linolénico (C18:3) (*figura 46*).

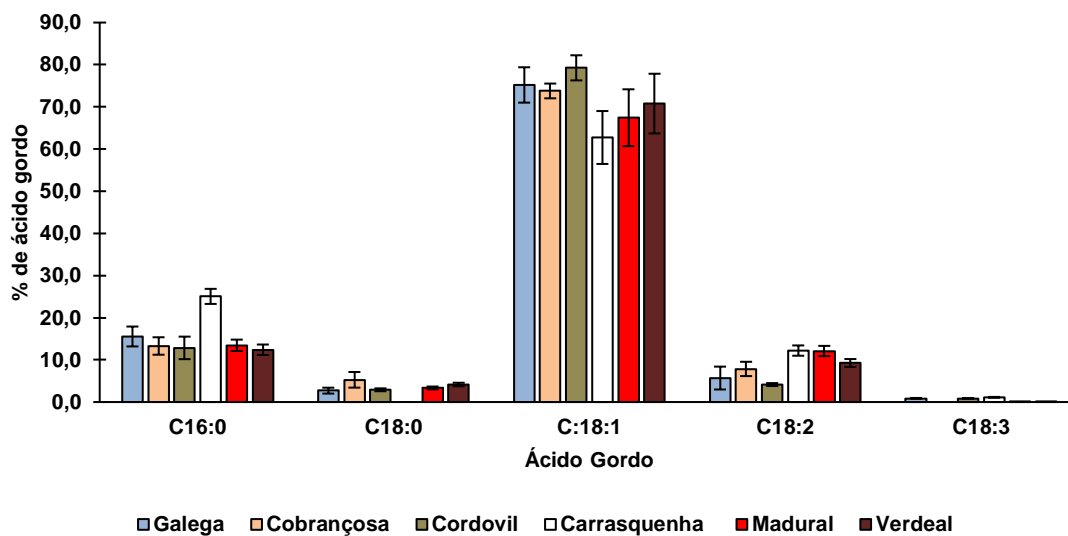


Figura 46 – Perfil nos principais ácidos gordos (percentagem) em função da variedade. (ácido gordo: C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:3 – ácido linolénico).

Em todas as amostras verifica-se a predominância do ácido oleico (C18:1), sendo o ácido gordo que apresenta a maior percentagem (em média 74,7%) na composição química dos azeites analisados. Em segundo lugar, surge o ácido palmítico (C16:0) com uma percentagem média de 13,7% e em terceiro lugar o ácido esteárico (C18:0) ou o ácido linoleico (C18:2), dependendo da amostra, uma vez que algumas delas possuem um maior teor em ácido esteárico (média de 4,2%), enquanto outras têm um maior teor de ácido linoleico (média de 7,1%) (*figura 46*). A relação de grandeza entre a percentagem de ácido oleico e ácido palmítico encontra-se dentro do esperado para azeites monovarietais portugueses, e de acordo com valores encontrados na literatura.¹⁶

Considerando os valores permitidos por lei para a percentagem de ácidos gordos no azeite extra virgem, os azeites monovarietais não apresentam discrepância em relação ao estipulado, encontrando-se dentro dos limites impostos por lei (*tabela 3*), nomeadamente no que toca aos valores permitidos para o ácido linolénico (C18:3), um indicador de qualidade e autenticidade dos azeites estudados, com valores médios de 0,75% para as amostras analisadas.

Quando comparadas amostras da mesma variedade ao longo da maturação não se verificou alterações significativas nos teores de cada ácido gordo havendo pequenas oscilações quer positivas, quer negativas ao longo do tempo.

Tentou-se perceber ainda, se a composição em ácidos gordos poderia influenciar o conteúdo em polifenóis, uma vez que estando estes implicados na proteção dos compostos lipídicos, poderiam ver a sua concentração diminuída no caso de azeites

mais ricos em ácidos gordos polinsaturados. Todavia, não foi registada qualquer relação entre a composição em ácidos gordos e a composição nos diferentes polifenóis.

V. Conclusões

Conclusões e perspetivas futuras

Este trabalho teve como objetivo a caracterização química de diferentes amostras de azeites extra virgens monovarietais portugueses de seis variedades diferentes (Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil, Galega, Madural e Verdeal) de duas proveniências diferentes (região do Alto Alentejo e região de Trás-os-Montes). A dita caracterização consistiu na quantificação dos compostos fenólicos presentes no azeite, bem como a determinação do perfil em ácidos gordos dos mesmos azeites. Foi ainda feita uma análise preliminar a todas as amostras, visando verificar o estado de conservação destes azeites, pela determinação do índice de acidez e de peróxidos das mesmas.

No que toca ao índice de peróxidos, todas as amostras apresentaram valores bastante abaixo dos 20 mEq O₂ kg⁻¹, limite permitido por lei, com valores entre os 5 os 7,5 mEq O₂ kg⁻¹. Quanto à determinação do índice de acidez, também todas as amostras apresentaram valores abaixo do limite permitido por lei, 1,00%. A maior parte dos azeites não ultrapassa o valor dos 0,2%, sendo que se registou valores a rondar os 0,4% para azeites monovarietais provenientes da variedade Galega para índices de maturação mais avançados. Este facto evidencia que o índice de maturação poderá influenciar o índice de acidez dos azeites. Uma vez que todas as amostras estavam dentro dos limites permitidos por lei quer para o índice de acidez, quer para o índice de peróxidos, efetuou-se a sua posterior análise aos restantes parâmetros descritos.

Determinou-se a composição em fenóis das diferentes amostras por UHPLC, tendo os extratos fenólicos sido obtidos por dois métodos distintos: extração por fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido. Os dois métodos apresentaram diferenças no que toca à concentração em fenóis totais, bem como no que toca à concentração de fenóis individuais. O método de extração líquido-líquido deu origem a uma maior concentração de fenóis individuais e consequentemente de fenóis totais. A análise dos extratos obtidos pela extração líquido-líquido revelou que os azeites monovarietais continham 325,95±16,40 a 751,61±53,72 mg de compostos fenólicos por cada quilograma de amostra, enquanto que o obtido pelo método de extração por fase sólida revelou um conteúdo em fenóis totais entre os 140,14±0,70 mg kg⁻¹ e 590,36±45,48 mg kg⁻¹.

A análise dos diferentes compostos fenólicos permitiu ter a noção de quais são os mais abundantes nos vários azeites monovarietais, denotando-se uma forte prevalência de secoiridóides (e até lignanos, em algumas amostras), a par de baixos níveis de

álcoois fenólicos e seus derivados (hidroxitirosol, tirosol ou acetato de tirosol). Esta conclusão permitiu aferir que, em primeiro lugar, as amostras apresentam um estado de conservação bom, dada a baixa degradação dos secoiridóides em álcoois fenólicos e, secundariamente, os azeites extra virgens monovarietais analisados apresentam um elevado teor em antioxidantes, conferindo uma elevada estabilidade ao produto, bem como propriedades nutricionais excepcionais.

Verificou-se para alguns azeites monovarietais que o índice de maturação influencia o valor dos fenóis totais, havendo diminuições com o avançar da maturação. Essa variação é perceptível nas amostras das variedades Cordovil e Cobrançosa. Verificou-se também a influência da variedade no perfil fenólico dos azeites monovarietais, observando-se altos níveis de fenóis para a variedade Verdeal e baixos para a variedade Carrasqueira.

Em relação ao teor em α -tocoferol, registaram-se valores médios de 537 ± 73 ppm, significativamente altos comparativamente aos valores até então encontrados para estudos semelhantes em azeites extra virgens monovarietais, enquanto que para o γ -tocoferol registaram-se valores médios de $22,5 \pm 4,5$ ppm, valores dentro do esperado pela literatura.

Todas as amostras apresentavam perfis em ácidos gordos característicos do azeite virgem extra, com a presença dos quatro principais ácidos gordos (ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2)) dentro das percentagens permitidas por lei, bem como ácido linolénico (C18:3) em quantidades vestigiais. A percentagem mais elevada é verificada para o ácido oleico (aproximadamente 74,7%), constituinte maioritário do azeite, seguido do ácido palmítico. O ácido esteárico e o ácido linoleico apresentam valores bastante baixos.

Em suma, todos estes dados constituem uma importante referência para o ramo científico e agrícola, fornecendo evidências sobre cada uma das variedades estudadas. É assim possível determinar quais as variedades que originam azeites mais ricos em antioxidantes, facto relevante na procura da produção de um produto com um maior valor nutricional e económico. Contudo, esta análise não deverá ser compreendida apenas a um ano. Deverão ser continuadas as análises nomeadamente nestas variedades durante pelo menos mais três anos com o intuito de traçar um perfil para cada uma delas, eliminando a influência de variáveis tais como os dados pedo-climáticos verificados ano após ano. De referir que a bibliografia encontrada sobre estudos de azeites monovarietais portugueses é muito reduzida, tendo sido neste trabalho efetuado, pela primeira vez, a quantificação de polifenóis em azeites monovarietais de Cordovil, Galega, Cobrançosa, Carrasqueira e Madural.

De referir que todos os azeites avaliados são azeites comercializados com condições para o uso de alegações de saúde não só devido ao seu conteúdo em ácidos gordos monoinsaturados ($\geq 45\%$) e insaturados ($\geq 70\%$), mas também devido ao alto conteúdo em polifenóis derivados de hidroxitirosol (> 5 mg/kg) e em tocoferol (≥ 75 ppm).

VI. Referências Bibliográficas

1. Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A.-H.; Saari, N., Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—a review. *International journal of molecular sciences* **2012**, *13* (3), 3291-3340.
2. Kiritsakis, A.; Shahidi, F., *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing*. John Wiley & Sons: 2017.
3. Heimler, D.; Pieroni, A.; Tattini, M.; Cimato, A., Determination of flavonoids, flavonoid glycosides and biflavonoids in *Olea europaea* L. Leaves. *Chromatographia* **1992**, *33* (7-8), 369-373.
4. Ferreira, I. C.; Barros, L.; Soares, M. E.; Bastos, M. L.; Pereira, J. A., Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry* **2007**, *103* (1), 188-195.
5. Ryan, D.; Robards, K., Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst* **1998**, *123* (5), 31R-44R.
6. Morales, A.; Leffelaar, P. A.; Testi, L.; Orgaz, F.; Villalobos, F. J., A dynamic model of potential growth of olive (*Olea europaea* L.) orchards. *European journal of agronomy* **2016**, *74*, 93-102.
7. Seabra, R. M.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Faria, M.; Paice, A. G.; Oliveira, M. B. P., Phenolic profiles of Portuguese olives: Cultivar and geographics. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Elsevier: 2010; pp 177-186.
8. Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The lancet oncology* **2000**, *1* (2), 107-112.
9. Servili, M.; Montedoro, G., Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, *104* (9-10), 602-613.
10. INSA PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar. <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?777> (acedido a 20-09-2019).
11. Visioli, F.; Galli, C., Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (10), 4292-4296.
12. Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C., Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews* **2002**, *22* (1), 65-75.
13. Foscolou, A.; Critselis, E.; Panagiotakos, D., Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas* **2018**, *118*, 60-66.
14. Wani, T. A.; Masoodi, F.; Gani, A.; Baba, W. N.; Rahmanian, N.; Akhter, R.; Wani, I. A.; Ahmad, M., Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol—A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *77*, 77-90.

15. Decreto-Lei n.º 343/88 de 28 de setembro. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação: Lisboa, 1988; Vol. 225, pp 3951-3956.
16. NP-972 - Norma Portuguesa Definitiva - Gorduras e Óleos Comestíveis | Azeite: Definição, classificação, características e acondicionamento. Inspeção Geral dos Produtos Agrícolas e Industriais - Repartição de Normalização: Lisboa, 1973.
17. Regulamento (UE) N.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro de 2013 em *Jornal Oficial da União Europeia*, Parlamento Europeu: Bruxelas, 2013; pp 671-854.
18. Commission Regulation (CE) No 656/95 em *Official Journal of the European Union*, European Commission: Brussels, 1995; Vol. 69, pp 1-12.
19. Regulamento (UE) N.º 61/2011 da Comissão de 24 de janeiro de 2011 em *Jornal Oficial da União Europeia*, Comissão Europeia: Bruxelas, 2011; p 1.
20. Cinquanta, L.; Esti, M.; Di Matteo, M., Oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2001**, 78 (12), 1197.
21. Vossen, P., Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience* **2007**, 42 (5), 1093-1100.
22. Morales, M.; Aparicio, R.; Calvente, J., Influence of olive ripeness on the concentration of green aroma compounds in virgin olive oil. *Flavour and Fragrance Journal* **1996**, 11 (3), 171-178.
23. Pedan, V.; Popp, M.; Rohn, S.; Nyfeler, M.; Bongartz, A., Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil. *Molecules* **2019**, 24 (11), 2041.
24. Boskou, D.; Blekas, G.; Tsimidou, M., Olive oil composition. In *Olive Oil*, Elsevier: 2006; pp 41-72.
25. Isabel Minguez-Mosquera, M.; Rejano-Navarro, L.; Gandul-Rojas, B.; Sanchez Gomez, A. H.; Garrido-Fernandez, J., Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1991**, 68 (5), 332-336.
26. Boskou, D., *Olive oil: chemistry and technology*. AOCS Publishing: 2006.
27. Sherwin, E., Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1976**, 53 (6 - Parte 2), 430-436.
28. Shahidi, F.; Janitha, P.; Wanasundara, P., Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition* **1992**, 32 (1), 67-103.
29. Goossens, B.; Marion, J., Quantifying vitamin E in vegetable oils with reversed-phase high performance liquid chromatography. *Concordia Coll J Anal Chem* **2011**, 2, 44-50.

30. Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A.-M., Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21* (2), 152-161.
31. Blekas, G.; Tsimidou, M.; Boskou, D., Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chemistry* **1995**, *52* (3), 289-294.
32. Rasrelli, L.; Passi, S.; Ippolito, F.; Vacca, G.; De Simone, F., Rate of degradation of α -tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**.
33. de la Torre-Carbot, K.; Jauregui, O.; Castellote, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; Covas, M.-I.; Casals, I.; López-Sabater, M. C., Rapid high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoproteins. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116* (1-2), 69-75.
34. Hashemi, P.; Serenjah, F. N.; Ghiasvand, A. R., Reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil. *Analytical Sciences* **2011**, *27* (9), 943-943.
35. Gordon, M. H.; Paiva-Martins, F.; Almeida, M., Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (5), 2480-2485.
36. Mateos, R.; Espartero, J. L.; Trujillo, M.; Rios, J.; León-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A., Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49* (5), 2185-2192.
37. Tuck, K. L.; Hayball, P. J., Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry* **2002**, *13* (11), 636-644.
38. Paiva-Martins, F.; Rodrigues, V.; Calheiros, R.; Marques, M. P., Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2011**, *91* (2), 309-314.
39. Owen, R.; Giacosa, A.; Hull, W.; Haubner, R.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H., The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer* **2000**, *36* (10), 1235-1247.
40. Huber, L. S.; Rodriguez-Amaya, D. B., Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara* **2008**, *19* (1), 97-108.

41. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* **1997**, *2* (4), 152-159.
42. Mian, K. H.; Mohamed, S., Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of agricultural and food chemistry* **2001**, *49* (6), 3106-3112.
43. Bravo, L., Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* **1998**, *56* (11), 317-333.
44. Seelinger, G.; Merfort, I.; Schempp, C. M., Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta medica* **2008**, *74* (14), 1667-1677.
45. Seelinger, G.; Merfort, I.; Wölflle, U.; Schempp, C., Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* **2008**, *13* (10), 2628-2651.
46. Owen, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H., Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* **2000**, *38* (8), 647-659.
47. MacRae, W. D.; Towers, G. N., Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **1984**, *23* (6), 1207-1220.
48. Schroeder, F. C.; del Campo, M. L.; Grant, J. B.; Weibel, D. B.; Smedley, S. R.; Bolton, K. L.; Meinwald, J.; Eisner, T., Pinoresinol: a lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (42), 15497-15501.
49. Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H., Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (7), 976-988.
50. Talhaoui, N.; Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A., Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* **2015**, *77*, 92-108.
51. Paiva-Martins, F. t.; Pinto, M., Isolation and characterization of a new hydroxytyrosol derivative from olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, *56* (14), 5582-5588.
52. Lucas, L.; Russell, A.; Keast, R., Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current pharmaceutical design* **2011**, *17* (8), 754-768.

53. Angelis, A.; Antoniadis, L.; Stathopoulos, P.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, L. A., Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO). *Phytochemistry letters* **2018**, *26*, 190-194.
54. Vinha, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B. M.; Valentao, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B., Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food chemistry* **2005**, *89* (4), 561-568.
55. Garcia, B.; Magalhães, J.; Fregapane, G.; Salvador, M. D.; Paiva-Martins, F., Potential of selected Portuguese cultivars for the production of high quality monovarietal virgin olive oil. *European journal of lipid science and technology* **2012**, *114* (9), 1070-1082.
56. Özcan, M. M.; Matthäus, B., A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology* **2017**, *243* (1), 89-99.
57. Martín-Peláez, S.; Covas, M. I.; Fitó, M.; Kušar, A.; Pravst, I., Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular nutrition & food research* **2013**, *57* (5), 760-771.
58. Bellumori, M.; Cecchi, L.; Innocenti, M.; Clodoveo, M. L.; Corbo, F.; Mulinacci, N., The EFSA health claim on olive oil polyphenols: Acid hydrolysis validation and total hydroxytyrosol and tyrosol determination in Italian virgin olive oils. *Molecules* **2019**, *24* (11), 2179.
59. Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 em *Official Journal of the European Union*, European Commission: Brussels 2012; pp 1-40.
60. Commission Regulation (EU) No 116/2010 of 9 February 2010 em *Official Journal of the European Union*, European Commission: Brussels, 2010; pp 16-18.
61. Council Directive of 24 September 1990 on nutrition labelling for foodstuffs em *Official Journal of the European Communities*, European Commission: Brussels, pp 40-44.
62. Frega, N.; Mozzon, M.; Lercker, G., Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76* (3), 325-329.
63. Frankel, E., Volatile lipid oxidation products. *Progress in lipid research* **1983**, *22* (1), 1-33.
64. Frankel, E. N., Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1984**, *61* (12), 1908-1917.
65. Lidon, F. J. C.; da Silva Ferreira, M. M. A., *Indústrias Alimentares: aditivos e tecnologia*. Escolar Editora: 2007.

66. Repetto, M.; Semprine, J.; Boveris, A., *Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination*. chapter: 2012; Vol. 1.
67. Frankel, E., Lipid oxidation. *Progress in lipid research* **1980**, 19 (1-2), 1-22.
68. Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S., Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2014**, 2014.
69. IOC Determination of Biophenols in Olive Oils by HPLC - COI/T.20/Doc No 29/Rev.1. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods> (acedido em 25-09-2019).
70. Bakre, S.; Gadmale, D.; Toche, R.; Gaikwad, V., Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of food science and technology* **2015**, 52 (5), 3093-3098.
71. Esporão Azeite Cordovil. <https://www.esporao.com/pt-pt/azeites/azeite-cordovil/> (acedido em 25-09-2019).

VII. Anexos

Anexo I – Análises preliminares efetuadas aos azeites | Índice de Acidez

Tabela 16 - Valores de acidez registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas em triplicado e respetiva média e desvio-padrão.

AMOSTRA						ACIDEZ / % de ácido oleico					
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g			Triplicado 1	Triplicado 2	Triplicado 3	\bar{x}	σ	
			Triplicado 1	Triplicado 2	Triplicado 3						
V_in_I	Galega (GAL)	IM ₂	5,0000	4,9990	4,9990	0,25	0,24	0,23	0,24	0,01	
V_in_II			4,9990	5,0010	5,0010	0,21	0,23	0,22	0,22	0,01	
S_in_I			4,9990	5,0000	5,0010	0,14	0,15	0,16	0,15	0,01	
S_in_II			5,0010	5,0000	5,0000	0,15	0,15	0,15	0,15	0,00	
FA_in_I			4,9990	5,0000	5,0010	0,22	0,24	0,24	0,24	0,01	
FA_in_II			5,0010	4,9990	5,0000	0,25	0,28	0,25	0,26	0,01	
FA_int_I			5,0000	5,0000	4,9990	0,25	0,27	0,25	0,26	0,01	
FA_int_II			4,9990	4,9990	4,9990	0,24	0,24	0,25	0,25	0,01	
AL_int_02-01_I		IM ₄	5,0010	4,9990	4,9990	0,23	0,24	0,24	0,24	0,01	
AL_int_02-01_II			4,9990	5,0000	5,0000	0,25	0,25	0,24	0,25	0,01	
AL_int_18-01_I		IM ₅	5,0010	4,9990	5,0010	0,19	0,21	0,21	0,20	0,01	
AL_int_18-01_II			5,0000	5,0000	5,0020	0,21	0,21	0,19	0,20	0,01	
S_int_CD_I		Cordovil (COR)	IM ₂	5,0010	5,0010	5,0010	0,28	0,28	0,25	0,27	0,01
S_int_CD_II				4,9990	5,0000	4,9990	0,28	0,29	0,28	0,28	0,01
MN_int_CD_I	IM ₄		4,9990	5,0000	5,0000	0,36	0,36	0,38	0,37	0,01	
MN_int_CD_II			5,0000	5,0000	4,9990	0,38	0,38	0,38	0,38	0,00	
FA_in_CD_I			4,9990	5,0000	5,0010	0,49	0,51	0,50	0,50	0,01	
FA_in_CD_II			5,0000	5,0000	4,9990	0,49	0,47	0,47	0,48	0,01	
FA_md_CD_I	IM ₅		5,0010	5,0010	5,0020	0,37	0,35	0,37	0,36	0,01	
FA_md_CD_II			5,0010	5,0020	5,0020	0,35	0,36	0,35	0,35	0,01	

AC_C_16_II	Cobrançosa (COB)	IM ₁	5,0010	4,9990	5,0000	0,25	0,25	0,24	0,25	0,01
AC_C_17_I			5,0020	5,0010	4,9990	0,23	0,23	0,24	0,24	0,01
AC_C_17_II			4,9990	5,0000	5,0000	0,24	0,24	0,22	0,24	0,01
RM_in_COB_I			5,0000	5,0000	5,0010	0,25	0,23	0,23	0,24	0,01
RM_in_COB_II			5,0010	5,0010	4,9990	0,23	0,24	0,24	0,24	0,01
FA_in_06-11_I			5,0010	5,0010	5,0020	0,23	0,25	0,25	0,25	0,01
FA_in_06-11_II			5,0000	5,0000	5,0010	0,23	0,24	0,25	0,24	0,01
RM_in_I		IM ₂	5,0010	5,0010	4,9990	0,21	0,21	0,20	0,20	0,01
RM_in_II			5,0000	5,0000	4,9990	0,19	0,20	0,20	0,19	0,01
RM_in_III			5,0000	5,0010	5,0010	0,22	0,23	0,22	0,22	0,01
M_in_I			5,0010	4,9990	5,0000	0,21	0,22	0,21	0,21	0,01
M_in_II			4,9990	5,0010	4,9990	0,20	0,21	0,21	0,20	0,01
FA_in_(19-11)_I			5,0000	4,9990	4,9990	0,25	0,23	0,25	0,25	0,01
FA_in_(19-11)_II			5,0000	5,0000	5,0020	0,24	0,24	0,23	0,24	0,01
S_int_I		IM ₃	5,0000	5,0010	5,0010	0,24	0,24	0,24	0,24	0,00
S_int_II			4,9990	4,9990	5,0000	0,25	0,23	0,23	0,24	0,01
MN_int_I			4,9990	5,0010	5,0000	0,24	0,24	0,25	0,25	0,01
MN_int_II			5,0000	5,0010	4,9990	0,27	0,25	0,25	0,26	0,01
RM_int			5,0010	5,0000	4,9990	0,23	0,24	0,23	0,24	0,01
RM_int			5,0010	5,0010	4,9990	0,27	0,25	0,28	0,27	0,01
FA_int_COB_I			5,0000	5,0000	4,9990	0,36	0,36	0,37	0,36	0,01
FA_int_COB_II			5,0000	5,0020	5,0010	0,37	0,37	0,37	0,37	0,00
FA_md_I		IM ₄	5,0010	5,0010	5,0010	0,31	0,32	0,32	0,32	0,01
FA_md_II			4,9990	4,9990	4,9990	0,30	0,30	0,31	0,31	0,01
RM_md_I			5,0010	4,9990	5,0010	0,23	0,23	0,23	0,23	0,00
RM_md_II			5,0000	4,9990	5,0000	0,23	0,25	0,25	0,25	0,01
S_md_I		IM ₅	5,0010	5,0000	5,0010	0,23	0,22	0,23	0,23	0,01
S_md_II			5,0010	5,0010	5,0020	0,22	0,23	0,23	0,23	0,01

FA_in_CARR_I	Carrasquenha (CAR)	IM ₂	5,0000	4,9990	5,0010	0,28	0,30	0,28	0,29	0,01
FA_in_CARR_II			5,0010	5,0010	4,9990	0,27	0,27	0,28	0,27	0,01
AC_M_14_I	Madural (MAD)	IM ₂	4,9990	5,0010	5,0000	0,23	0,23	0,25	0,24	0,01
AC_M_14_II			5,0000	5,0010	5,0020	0,24	0,27	0,27	0,26	0,01
AC_V_10_I	Verdeal (VER)	IM ₂	5,0020	5,0020	5,0010	0,24	0,24	0,23	0,24	0,01
AC_V_10_II			5,0010	5,0010	5,0020	0,25	0,23	0,24	0,24	0,01

Anexo II – Análises preliminares efetuadas aos azeites | Índice de Peróxidos

Tabela 17 – Índice de peróxidos registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas em triplicado e respetiva média e desvio-padrão.

AMOSTRA						ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP) / mEq O ₂ kg ⁻¹					
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g			Triplicado 1	Triplicado 2	Triplicado 3	\bar{x}	σ	
			Triplicado 1	Triplicado 2	Triplicado 3						
V_in_I	Galega (GAL)	IM ₂	0,5007	0,5016	0,5058	6,39	6,38	6,33	6,37	0,03	
V_in_II			0,5033	0,5030	0,5083	6,56	6,56	6,69	6,60	0,08	
S_in_I			0,5068	0,5061	0,5070	4,93	5,14	4,93	5,00	0,12	
S_in_II			0,5030	0,5027	0,5014	4,97	4,97	4,99	4,98	0,01	
FA_in_I			0,5017	0,5048	0,5015	5,98	5,74	5,78	5,84	0,13	
FA_in_II			0,5049	0,5050	0,5032	6,14	6,14	6,16	6,15	0,01	
FA_int_I			0,5004	0,5028	0,5019	6,39	6,36	6,58	6,44	0,11	
FA_int_II			0,5016	0,5014	0,5009	7,08	6,98	6,99	7,02	0,05	
AL_int_02-01_I		IM ₄	0,5030	0,5060	0,5060	7,06	7,02	6,92	7,00	0,07	
AL_int_02-01_II			0,5020	0,5010	0,5040	6,57	6,39	6,55	6,50	0,10	
AL_int_18-01_I		IM ₅	0,5013	0,5034	0,5039	6,38	6,56	6,55	6,50	0,10	
AL_int_18-01_II			0,5020	0,5005	0,5009	6,57	6,39	6,59	6,52	0,11	
S_int_CD_I		Cordovil (COR)	IM ₂	0,5050	0,5030	0,5020	6,24	6,16	6,18	6,19	0,04
S_int_CD_II				0,5040	0,5040	0,5000	5,75	5,75	5,70	5,74	0,03
MN_int_CD_I	IM ₄		0,4990	0,5000	0,5040	4,21	4,40	4,27	4,29	0,10	
MN_int_CD_II			0,5010	0,5030	0,5030	4,59	4,57	4,47	4,55	0,06	
FA_in_CD_I			0,5000	0,5040	0,5010	5,40	5,46	5,59	5,48	0,10	
FA_in_CD_II			0,5020	0,5050	0,5040	5,38	5,15	5,16	5,23	0,13	
FA_md_CD_I	IM ₅		0,5044	0,5040	0,5060	6,25	6,05	6,03	6,11	0,12	
FA_md_CD_II			0,5007	0,5020	0,5010	6,19	6,18	6,19	6,18	0,01	

AC_C_16_I/II	Cobrançosa (COB)	IM ₁	0,5000	0,5040	0,5010	6,40	6,25	6,39	6,35	0,08
AC_C_17_I			0,5020	0,5030	0,5010	7,27	7,36	7,39	7,34	0,06
AC_C_17_II			0,5030	0,5040	0,5030	7,55	7,54	7,36	7,48	0,11
RM_in_COB_I			0,5010	0,5050	0,5010	8,58	8,51	8,38	8,49	0,10
RM_in_COB_II			0,5010	0,5030	0,5030	7,58	7,36	7,46	7,47	0,11
FA_in_06-11_I			0,5030	0,5040	0,5000	6,96	6,94	7,20	7,03	0,14
FA_in_06-11_II			0,5010	0,5010	0,5040	6,19	6,29	6,15	6,21	0,07
RM_in_I		IM ₂	0,5025	0,5059	0,5038	7,76	7,87	7,74	7,79	0,07
RM_in_II ¹			0,5006	0,5024	0,5029	9,19	9,16	9,15	9,16	0,02
RM_in_III			0,5020	0,5038	0,5038	8,17	7,94	7,94	8,02	0,13
M_in_I			0,5048	0,5053	0,5052	5,94	6,13	6,14	6,07	0,11
M_in_II			0,5029	0,5090	0,5035	5,77	5,70	5,96	5,81	0,14
FA_in_(19-11)_I			0,5053	0,5036	0,5042	5,84	5,96	5,95	5,92	0,07
FA_in_(19-11)_II			0,5043	0,5039	0,5033	6,15	5,95	5,96	6,02	0,11
S_int_I		IM ₃	0,5080	0,5020	0,5030	6,10	6,08	6,26	6,15	0,10
S_int_II			0,4990	0,5050	0,5030	6,51	6,34	6,36	6,40	0,10
MN_int_I			0,5060	0,5060	0,5080	6,52	6,52	6,50	6,51	0,01
MN_int_II			0,5010	0,4990	0,5000	6,79	6,61	6,80	6,73	0,10
RM_int			0,5000	0,5010	0,4990	5,00	4,99	4,91	4,97	0,05
RM_int			0,5000	0,5060	0,5010	4,00	3,95	4,19	4,05	0,13
FA_int_COB_I			0,5050	0,5030	0,5050	7,52	7,46	7,33	7,44	0,10
FA_int_COB_II			0,5040	0,5080	0,5010	7,34	7,19	7,19	7,24	0,09
FA_md_I		IM ₄	0,5020	0,5010	0,5070	7,17	6,99	6,90	7,02	7,17
FA_md_II			0,5040	0,5070	0,5070	6,65	6,51	6,51	6,55	6,65
RM_md_I			0,5010	0,4990	0,5060	5,79	5,81	5,93	5,84	0,08
RM_md_II			0,5000	0,5020	0,5050	5,90	5,78	5,94	5,87	0,09
S_md_I		IM ₅	0,5096	0,5087	0,5064	4,51	4,52	4,34	4,46	0,10

¹ A amostra "RM_in_II" não foi utilizada no cálculo da média nem do desvio-padrão, uma vez que apresentou um resultado de índice de peróxidos demasiado elevado para azeite virgem extra.

S_md_II			0,5005	0,5018	0,5008	4,80	4,78	4,59	4,72	0,11
FA_in_CARR_I	Carrasquenha (CAR)	IM ₂	0,5030	0,5020	0,5030	7,55	7,37	7,55	7,49	0,11
FA_in_CARR_II			0,5040	0,5010	0,5040	7,74	7,58	7,64	7,65	0,08
AC_M_14_I	Madural (MAD)	IM ₂	0,5050	0,5080	0,5030	6,83	6,99	6,96	6,93	0,08
AC_M_14_II			0,5070	0,5080	0,5080	6,51	6,50	6,40	6,47	0,06
AC_V_10_I	Verdeal (VER)	IM ₂	0,5030	0,5040	0,5050	7,46	7,24	7,23	7,31	0,13
AC_V_10_II			0,5070	0,5040	0,5010	6,21	6,15	6,19	6,18	0,03

Anexo III – Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite | Obtenção das retas de calibração

Tabela 18 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de hidroxitirosol (HyTy) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>Hidroxitirosol (HyTy)</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de HyTy / M			5,12 x 10 ⁻³
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μ L	Volume Total / μ L	Concentração de HyTy / M	Área
50	2000	1,28 x 10 ⁻⁴	2,8922
100		2,56 x 10 ⁻⁴	5,8020
150		3,84 x 10 ⁻⁴	8,8585
200		5,12 x 10 ⁻⁴	12,1674
300		6,83 x 10 ⁻⁴	16,6257
350		8,97 x 10 ⁻⁴	20,3198

Tabela 19 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de tirosol (Ty) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>Tirosol (Ty)</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de Ty / M			5,13 x 10 ⁻³
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μ L	Volume Total / μ L	Concentração de Ty / M	Área
50	2000	1,28 x 10 ⁻⁴	1,5220
100		2,57 x 10 ⁻⁴	2,9091
150		3,85 x 10 ⁻⁴	4,7509
200		5,13 x 10 ⁻⁴	6,4905
300		6,84 x 10 ⁻⁴	8,8257
350		8,98 x 10 ⁻⁴	11,1698

Tabela 20 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de oleuropeína (OI.) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>Oleuropeína (OI.)</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de OI. / M			5,06 x 10 ⁻³
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μ L	Volume Total / μ L	Concentração de OI. / M	Área
50	2000	1,15 x 10 ⁻⁴	1,9904
100		2,29 x 10 ⁻⁴	4,0545
150		3,41 x 10 ⁻⁴	5,8008
200		4,53 x 10 ⁻⁴	8,4243
250		5,65 x 10 ⁻⁴	9,9846
350		7,94 x 10 ⁻⁴	14,7912

Tabela 21 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de acetato de hidroxitirosol (HyTyAc) e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>Acetato de Hidroxitirosol (HyTyAc)</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de HyTyAc / M		5,09 x 10 ⁻³	
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μL	Volume Total / μL	Concentração de HyTyAc / M	Área
50	2000	1,27 x 10 ⁻⁴	2,7117
100		2,54 x 10 ⁻⁴	5,2259
150		3,81 x 10 ⁻⁴	8,3417
200		5,09 x 10 ⁻⁴	11,5092
300		6,78 x 10 ⁻⁴	15,2604
350		8,90 x 10 ⁻⁴	20,2554

Tabela 22 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de 3,4-DHPEA-EDA e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>3,4-DHPEA-EDA</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de 3,4-DHPEA-EDA / M		2,93 x 10 ⁻³	
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / µL	Volume Total / µL	Concentração de 3,4-DHPEA-EDA / M	Área
50	2000	7,34 x 10 ⁻⁵	1,9576
100		1,47 x 10 ⁻⁴	3,5847
150		2,20 x 10 ⁻⁴	5,7402
200		2,93 x 10 ⁻⁴	8,0201
250		3,67 x 10 ⁻⁴	9,3862
350		5,14 x 10 ⁻⁴	13,8762

Tabela 23 - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de 3,4-DHPEA-EA e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: <u>3,4-DHPEA-EA</u>			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de 3,4-DHPEA-EA / M		5,00 x 10 ⁻³	
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μ L	Volume Total / μ L	Concentração de 3,4-DHPEA-EA / M	Área
50	2000	1,25 x 10 ⁻⁴	1,8301
100		2,50 x 10 ⁻⁴	3,3419
150		3,75 x 10 ⁻⁴	5,5142
200		5,00 x 10 ⁻⁴	7,4542
250		6,25 x 10 ⁻⁴	8,8063
350		8,75 x 10 ⁻⁴	12,7822

Anexo IV – Determinação de compostos fenólicos presentes no azeite | Compostos fenólicos individuais e totais presentes no azeite extraídos por Extração Líquido-Líquido e por Extração por Fase Sólida

Tabela 24 - Valores de concentração de fenóis individuais e fenóis totais extraídos por extração líquido-líquido.

AMOSTRA				[FENÓIS] / mg kg ⁻¹											
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g	HyTy	Ty	HyTyAc	HyTy-EDA	Ty-EDA	TyAc	Py	PyAc	Oi. + Oi. A	Ty-EA	HyTy-EDA	Concentração Total
V_in	Galega (GAL)	IM ₂	2,0059	10,06	4,99	22,50	89,12	64,79	24,29	20,03	20,03	42,79	16,69	89,37	443,40
S_in			2,0009	8,15	6,98	6,72	76,04	51,30	22,79	56,37	56,37	66,29	66,48	71,67	490,34
FA_in			2,0014	9,58	8,98	7,62	13,04	18,48	11,98	61,63	61,63	42,26	109,99	54,96	382,39
FA_int			1,9996	3,36	6,34	7,75	42,91	121,73	37,71	25,74	25,74	69,87	15,84	154,07	517,97
AL_int_02-01		IM ₄	1,9993	3,16	7,92	6,41	18,65	51,39	12,86	43,97	43,97	34,31	51,59	59,89	331,23
AL_int_18-01		IM ₅	2,0051	1,50	9,16	-	29,26	50,68	19,58	46,17	46,17	47,44	28,58	55,93	1,50
S_int_CD	Cordovil (COR)	IM ₂	2,0012	2,88	14,43	-	47,72	65,19	28,90	13,83	13,83	70,37	27,89	198,41	538,80
MN_int_CD		IM ₄	2,0005	24,84	23,08	5,95	54,27	78,85	33,04	17,22	17,22	74,50	50,03	237,07	665,33
FA_in_CD			2,0007	18,79	14,91	-	47,75	54,75	31,94	16,25	16,25	56,57	13,33	160,69	491,55
FA_md_CD		IM ₅	1,9952	12,67	13,09	-	44,50	57,25	24,06	10,47	10,47	67,41	12,07	198,21	495,18
AC_C_16	Cobrançosa (COB)	IM ₁	2,0006	5,43	5,49	-	66,14	132,83	24,80	22,74	27,55	63,10	12,17	137,01	497,26
AC_C_17			2,0005	2,76	3,34	-	58,72	149,44	21,51	21,38	26,41	55,07	21,46	124,40	484,48
RM_in_COB			2,0085	2,26	4,25	5,50	48,59	101,56	69,77	35,09	35,09	142,80	30,47	212,91	718,09
FA_in_06-11			2,0008	3,36	6,35	7,75	42,91	121,74	37,71	25,75	32,65	69,88	15,84	308,13	669,07

RM_in		IM ₂	2,0033	4,01	4,75	6,36	59,45	84,15	26,06	29,56	29,56	64,24	38,57	98,10	455,14
M_in			2,0074	3,33	4,41	7,00	69,85	61,98	21,25	29,44	29,44	35,33	41,97	104,96	414,60
FA_in_(19-11)			2,0030	2,91	4,98	8,08	34,39	80,25	26,36	23,21	23,21	59,39	34,48	135,64	441,33
S_int		IM ₃	2,0001	5,31	6,39	-	35,66	62,23	27,48	17,29	27,02	71,66	24,31	142,46	419,81
MN_int			1,9997	3,81	7,94	0,00	55,82	81,21	32,46	21,94	21,94	85,53	16,13	164,77	498,82
RM_int			1,9998	3,84	7,61	-	65,21	52,06	49,68	24,53	54,31	80,04	28,08	261,06	626,42
FA_int_COB			2,0006	7,72	14,51	6,84	24,35	47,49	28,64	18,95	24,42	48,17	14,14	122,87	358,10
FA_md		IM ₄	1,9998	8,02	7,05	-	64,26	78,12	24,32	16,20	14,15	49,01	10,35	179,55	451,03
RM_md			2,0080	6,78	8,97	-	53,65	65,19	46,35	25,07	45,55	127,08	23,73	267,94	670,31
S_md		IM ₅	2,0019	2,05	8,00	-	23,72	50,86	40,60	20,64	38,05	72,38	18,89	179,55	454,74
FA_in_CARR	Carrasquenha (CAR)	IM ₂	2,0069	2,91	3,79	7,02	8,48	18,20	13,68	31,43	31,43	66,70	28,77	69,86	265,51
AC_M_14	Madural (MAD)	IM ₂	2,0019	2,32	4,06	-	92,29	196,85	31,43	18,94	30,97	53,27	79,20	86,97	596,29
AC_V_10	Verdeal (VER)	IM ₂	2,0010	2,76	7,16	-	82,32	285,73	27,46	59,37	41,13	80,94	71,80	92,93	751,61

Tabela 25 - Valores de concentração de fenóis individuais e fenóis totais extraídos por extração por fase sólida (SPE).

AMOSTRA				[FENÓIS] / mg kg ⁻¹											
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g	HyTy	Ty	HyTyAc	HyTy-EDA	Ty-EDA	TyAc	Py	PyAc	OI. + OI. A	Ty-EA	HyTy-EDA	Concentração Total
V_in	Galega (GAL)	IM ₂	25,00	9,12	3,88	1,87	48,54	35,32	7,72	16,79	24,52	32,65	48,31	16,45	245,17
S_in			25,01	5,19	4,77	0,18	50,01	34,33	6,53	51,53	50,64	16,80	35,26	8,03	263,27
FA_in			25,00	7,99	7,61	0,15	5,41	12,68	1,88	58,46	44,99	9,59	30,39	53,28	232,43
FA_int			25,01	9,72	7,76	0,64	10,84	90,84	4,26	33,00	10,95	44,51	9,90	16,57	238,99
AL_int_02-01		IM ₄	25,01	1,04	9,64	0,33	5,53	55,82	1,10	30,19	8,60	5,68	8,56	13,64	140,13
AL_int_18-01		IM ₅	25,03	1,74	0,27	-	15,31	41,10	1,58	55,34	9,88	22,59	8,66	11,00	167,47
S_int_CD	Cordovil (COR)	IM ₂	25,00	2,60	13,83	-	17,72	50,71	10,76	55,50	77,01	52,85	60,53	117,56	459,07
MN_int_CD		IM ₄	25,00	15,48	27,88	0,09	22,69	37,97	14,79	50,96	99,70	217,07	70,62	152,19	709,44
FA_in_CD			25,01	18,69	14,27	0,93	28,71	24,11	21,37	53,70	54,56	79,43	27,18	83,28	406,23
FA_md_CD		IM ₅	25,01	8,92	12,74	0,17	25,72	26,39	6,80	40,72	74,56	138,90	47,52	229,60	612,04
AC_C_16	Cobraçosa (COB)	IM ₁	25,00	1,26	2,54	0,00	46,46	17,96	43,60	17,16	18,05	46,20	123,23	12,41	328,87
AC_C_17			25,01	0,97	1,94	0,00	31,87	16,29	39,53	11,45	11,02	34,26	91,23	10,73	249,29
RM_in_COB			25,00	1,86	3,29	-	30,53	55,88	6,81	31,63	41,53	270,77	34,51	63,26	540,07
FA_in_06-11			25,01	2,78	4,81	-	34,20	44,38	5,05	18,65	33,24	130,75	30,58	97,67	402,11
RM_in		IM ₂	26,00	2,88	3,73	0,13	36,51	50,64	8,57	27,56	33,64	76,87	64,96	24,33	329,82
M_in			25,00	2,49	3,26	0,13	45,08	61,19	10,40	30,72	39,52	114,07	72,08	26,68	405,62
FA_in_(19-11)			25,01	2,10	3,91	0,03	21,36	63,46	19,22	25,19	26,99	188,03	108,72	69,69	528,7
S_int		IM ₃	25,01	2,02	7,68	0,10	20,90	45,13	4,91	36,44	64,92	118,20	43,43	99,10	442,83
MN_int			25,00	20,49	28,01	0,25	18,66	57,81	11,09	15,24	70,52	196,20	51,29	107,65	577,21
RM_int			25,00	1,95	3,91	-	36,09	75,80	17,36	21,89	92,29	137,89	61,68	142,13	590,99
FA_int_COB			25,01	2,78	12,76	0,88	13,26	33,13	3,25	12,34	34,99	64,44	28,71	53,42	259,96
FA_md			IM ₄	25,00	8,31	8,64	0,63	55,39	30,95	6,84	11,97	50,76	125,93	32,81	77,48

Teor em Antioxidantes de Azeites Extra Virgens Monovarietais Portugueses

RM_md			25,00	10,42	17,81	-	35,24	51,83	7,69	25,22	123,24	221,26	65,39	188,13	746,23
S_md		IM ₅	25,01	1,41	7,63	0,11	13,53	44,91	3,69	25,33	68,72	170,91	49,66	104,90	490,8
FA_in_CARR	Carrasquenha (CAR)	IM ₂	25,02	1,43	3,38	2,20	3,97	43,46	0,91	6,62	9,11	25,38	6,29	13,87	116,62
AC_M_14	Madurai (MAD)	IM ₂	25,01	1,96	3,69	0,00	77,36	67,56	163,94	12,43	14,26	24,09	106,32	14,68	486,29
AC_V_10	Verdeal (VER)	IM ₂	25,00	3,84	9,25	0,00	57,38	97,44	236,53	13,25	51,54	29,76	115,71	13,14	627,84

Anexo V – Determinação de α -tocoferol e γ -tocoferol presentes no azeite | Obtenção das retas de calibração**Tabela 26** - Concentração da solução *stock* e das soluções padrão de α -tocoferol e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: α -tocoferol			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de α -tocoferol / M			$3,94 \times 10^{-3}$
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução <i>Stock</i> adicionado / μ L	Volume Total / μ L	Concentração de α -tocoferol / M	Área
50	$1,00 \times 10^4$	$1,97 \times 10^{-5}$	0,2691
100		$3,94 \times 10^{-5}$	0,5562
150		$5,77 \times 10^{-5}$	0,8712
200		$7,87 \times 10^{-5}$	1,1310
300		$1,18 \times 10^{-4}$	1,7179
400		$1,57 \times 10^{-4}$	2,3139

Tabela 27 - Concentração da solução stock e das soluções padrão de γ -tocoferol e respetivas áreas dos picos registados em UPLC.

RETA PADRÃO Composto: γ-tocoferol			
SOLUÇÃO STOCK			
Concentração de γ-tocoferol / M		$1,67 \times 10^{-2}$	
SOLUÇÕES PADRÃO			
Volume de Solução Stock adicionado / μL	Volume Total / μL	Concentração de γ-tocoferol / M	Área
20	$2,00 \times 10^4$	$4,18 \times 10^{-5}$	0,6824
100		$8,35 \times 10^{-5}$	1,3606
150		$1,25 \times 10^{-4}$	2,0071
200		$1,67 \times 10^{-4}$	2,7983
300		$2,51 \times 10^{-4}$	4,1630

Anexo VI – Determinação de α -tocoferol e γ -tocoferol presentes no azeiteTabela 28 - Valores de concentração de α -tocoferol e γ -tocoferol registados para as amostras de azeite virgem extra analisadas.

AMOSTRA				[TOCOFERÓIS] / mg kg ⁻¹		
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g	α -tocoferol	γ -tocoferol	
V_in_I	Galega (GAL)	IM ₂	0,498	602,74	21,87	
V_in_II			0,501	587,34	22,95	
S_in_I			0,501	581,59	25,59	
S_in_II			0,498	577,45	26,42	
FA_in_I			0,502	588,49	33,94	
FA_in_II			0,501	591,50	32,95	
FA_int_I			0,503	587,03	24,61	
FA_int_II			0,5	600,65	25,31	
AL_int_02-01_I		IM ₄	0,5	497,79	27,70	
AL_int_02-01_II			0,501	499,33	27,65	
AL_int_18-01_I		IM ₅	0,501	419,64	22,92	
AL_int_18-01_II			0,502	416,04	23,61	
S_int_CD_I		Cordovil (COR)	IM ₂	0,498	483,31	15,22
S_int_CD_II				0,501	485,81	15,16
MN_int_CD_I	IM ₄		0,502	530,93	23,53	
MN_int_CD_II			0,499	531,73	23,52	
FA_in_CD_I			0,503	551,39	24,03	
FA_in_CD_II			0,5	542,92	24,23	
FA_md_CD_I	IM ₅		0,502	560,73	17,31	
FA_md_CD_II			0,5	573,39	17,86	

AC_C_16_I/II	Cobrançosa (COB)	IM ₁	0,4995	527,82	23,31
AC_C_17_I			0,498	515,24	21,11
AC_C_17_II			0,498	531,19	22,10
RM_in_COB_I			0,502	493,02	22,50
RM_in_COB_II			0,5	483,79	23,22
FA_in_06-11_I			0,502	592,99	21,50
FA_in_06-11_II			0,501	598,48	23,07
RM_in_I		IM ₂	0,5	475,14	22,21
RM_in_II			0,501	492,50	23,85
RM_in_III			0,505	346,11	23,32
M_in_I			0,503	451,47	22,81
M_in_II			0,501	485,57	23,50
FA_in_(19-11)_I			0,502	489,51	7,53
FA_in_(19-11)_II			0,5	480,58	8,69
S_int_I		IM ₃	0,5	643,24	21,89
S_int_II			0,502	630,88	22,68
MN_int_I			0,5	621,71	26,52
MN_int_II			0,499	531,73	25,61
RM_int			0,503	533,10	23,68
RM_int			0,5	546,23	25,08
FA_int_COB_I			0,501	547,40	21,50
FA_int_COB_II		0,501	555,42	23,07	
FA_md_I		IM ₄	0,502	703,33	24,63
FA_md_II			0,501	682,21	24,53
RM_md_I			0,503	504,69	23,36
RM_md_II			0,498	538,60	23,31
S_md_I		IM ₅	0,502	586,55	23,83
S_md_II			0,502	583,55	17,79

FA_in_CARR_I	Carrasquenha (CAR)	IM ₂	0,502	738,48	20,37
FA_in_CARR_II			0,502	627,56	18,69
AC_M_14_I	Madural (MAD)	IM ₂	0,501	522,91	16,31
AC_M_14_II			0,499	507,08	15,75
AC_V_10_I	Verdeal (VER)	IM ₂	0,501	376,22	21,16
AC_V_10_II			0,502	388,83	22,75

Anexo VII – Determinação da Composição em Ácidos Gordos

Tabela 29 - Valores percentuais dos principais ácidos gordos presentes nas amostras de azeite virgem extra analisadas (ácido palmítico – C16:0, ácido esteárico – C18:0, ácido oleico – C18:1, ácido linoleico – C18:2 e ácido linolénico – C18:3).

AMOSTRA				ÁCIDOS GORDOS / %				
Nome	Variedade	Índice de Maturação (IM _x)	Massa Aferida / g	Ácido Palmítico C16:0	Ácido Esteárico C18:0	Ácido Oleico C18:1	Ácido Linoleico C18:2	Ácido Linolénico C18:3
V_in	Galega (GAL)	IM ₂	0,2080	16,3	2,9	69,0	11,2	0,7
S_in			0,2150	16,7	1,8	75,8	4,8	0,8
FA_in			0,2080	17,2	3,9	73,1	5,0	0,8
FA_int			0,2040	17,6	2,4	74,0	4,9	1,0
AL_int_02-01		IM ₄	0,2100	14,0	2,7	78,5	4,0	0,9
AL_int_18-01		IM ₅	0,2100	11,5	2,5	80,9	4,2	1,0
S_int_CD_I	Cordovil (COR)	IM ₂	0,2090	12,0	2,6	80,7	3,8	0,8
MN_int_CD_I		IM ₄	0,2020	9,8	2,8	82,3	4,3	0,8
FA_in_CD_I			0,2100	11,7	2,6	80,2	4,4	1,0
FA_md_CD		IM ₅	0,2150	16,9	3,4	74,5	4,5	0,7
AC_C_16	Cobrançosa (COB)	IM ₁	0,2010	10,9	4,6	75,8	7,9	0,001422
AC_C_17			0,2170	13,5	5,1	72,4	8,0	0,002038
RM_in_COB			0,2090	15,7	3,8	70,5	9,1	0,9
FA_in_06-11			0,2130	14,7	4,7	72,2	7,5	0,9
RM_in		IM ₂	0,2130	14,1	3,3	73,7	8,0	0,9
M_in			0,2150	15,9	4,2	76,7	2,5	0,7
FA_in_(19-11)			0,206	15,7	10,9	62,9	9,8	0,7

S_int_I		IM ₃	0,2100	11,0	8,0	72,5	7,6	0,9
MN_int_I			0,2040	12,3	5,2	73,5	8,1	1,0
RM_int			0,2080	10,7	4,1	75,2	9,1	0,9
FA_int_COB_I			0,2110	17,0	5,3	66,9	9,5	1,3
FA_md_I		IM ₄	0,2100	11,4	5,9	74,6	7,0	1,1
RM_md_I			0,2130	12,6	4,6	73,2	8,7	0,9
S_md_I			0,2100	11,0	5,9	76,1	6,2	0,8
FA_in_CARR_I	Carrasqueira (CAR)	IM ₂	0,2020	17,9	2,2	67,6	11,3	1,1
AC_M_14_I	Madural (MAD)	IM ₂	0,2050	13,5	3,3	70,2	12,0	0,004789
AC_V_10	Verdeal (VER)	IM ₂	0,2090	12,4	4,1	73,6	9,2	0,003899