

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Efeito da ação do *Colletotrichum acutatum* na qualidade da
azeitona de diferentes cultivares em três estados de maturação**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Engenharia Alimentar

Rafael André Barradas Vilas Boas

Orientadores:

Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

Doutora Irene Pereira Gouvinhas



Vila Real, 2019

Orientadora

(Professora Doutora Ana Barros)

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Co-orientadora

(Doutora Irene Gouvinhas)

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Direção de Curso

(Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro)

The authors want to acknowledge Interreg Program for the financial support of the Project IBERPHENOL, Project Number 0377_IBERPHENOL_6_E, co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) through POCTEP 2014-2020.

Vila Real, 2019

“O próprio Senhor marchará à tua frente. Ele estará sempre contigo! Nunca te deixará, jamais te abandonará! Não tenhas medo, nem te apavores!”

Deuterónimo 31:8

Agradecimentos

Depois de concluído este trabalho, só me resta dar o meu voto de agradecimento as minhas orientadoras, a professora Ana Barros e a doutora Irene Gouvinhas pela paciência e disponibilidade e mestria no ensino que até aqui adquiri, ainda a todos os que me ajudaram e me apoiaram para que tivesse a confiança e a coragem para chegar ao fim.

À minha família, especialmente à minha avó que me troca o nome e se chateia comigo, mas que no fundo ela ama-me assim como a todos os seus netos. Às minhas tias e tios que me dão um empurrão para continuar, e por fim a todos os meus primos que sem eles a vida não seria engraçada.

A ti, minha princesa Inês Vítor, que foste nestes dois anos uma peça fundamental para eu continuar, por fazeres parte da minha vida, por me ajudares a ver as coisas de uma forma diferente, pela companhia que me fazes todos os dias, por todo o teu amor e carinho e por nunca me deixares desistir, um obrigado do fundo do coração.

Aos meus colegas, com quem tive a oportunidade de conhecer e vivenciar de uma forma espetacular. Aos meus dois compadres Diogo e Luís pelas demais ressacas e viagens e que nunca percamos aquilo que nos une: a amizade. Às minhas comadres Anita, Soraia, Lia, Vanessa, Ju e Catarina que me têm feito sempre companhia e que me aturam a cada ano que passa. Tenho-vos no coração.

Por fim, e não menos importantes, os meus pais, por me fazerem ver que, se tudo na vida for feito com esforço e persistência tudo conseguimos, agradeço também por serem o meu suporte, por me darem coragem, por persistirem e nunca desistirem de mim, por me darem lições de vida e serem maravilhosos

Índice Geral

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	
1. Enquadramento temático.....	1
1.1. Introdução	2
1.2. Fatores que influenciam a composição e qualidade da azeitona.....	4
1.2.1. Cultivar.....	6
1.2.2. Maturação.....	6
1.2.3. Doenças da oliveira.....	7
1.2.3.1. Antracnose da oliveira.....	8
1.3. Combate e controlo da antracnose.....	9
1.4. Cromatografia e espectroscopia para análise da composição da azeitona	10
1.4.1 <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	10
1.5. Objetivos	11
Capítulo 2 - Material e Métodos	
2.1. Amostragem.....	13
2.2. Determinação do teor em fenóis totais	14
2.3. Determinação do teor em <i>orto</i> -difenóis.....	14
2.4. Determinação do teor em flavonoides	15
2.5. Determinação da atividade antioxidante (ABTS)	16
2.6. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC.....	17
2.7. Análise estatística.....	18
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	
3.1. Composição fenólica de azeitonas.....	20
3.2. Atividade antioxidante.....	24
3.3. Análise cromatográfica das azeitonas.....	25
3.3.1. Influência do estado de maturação.....	25
3.3.2. Efeito do ataque do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	28
Capítulo 4 – Conclusão	
4 – Conclusão.....	31
Capítulo 5 – Bibliografia	
5 - Bibliografia.....	33

Índice de Figuras

Figura 1: Comparação da produção de azeitonas em 1000 toneladas, entre a União Europeia e a Mundial.	3
Figura 2: Representação gráfica: (A) da % de área (ha) ocupada por olivais em Portugal; (B) quantidade (ton) de azeite produzido em Portugal.	4
Figura 3: Configuração química da oleuropeína e do hidroxitirosol.	6
Figura 4: Índice de maturação	7
Figura 5: Representação gráfica dos teores em; A) orto-difenóis em que as médias (n=3) são apresentadas em mg AG g ⁻¹ ; B) Fenóis totais em que as médias (n=3) são apresentadas em mg AG g ⁻¹ ; C) Flavonoides em que as médias (n=3) são apresentadas em mg CAT g ⁻¹	23
Figura 6: Gráfico da atividade antioxidante pelo método de ABTS	24

Índice de Tabelas

Tabela 1: Designação dos códigos das amostras no diferentes estado de maturação, e data de colheita	13
Tabela 2: Programa de eluentes; (A)- água: ácido fórmico, (B)- acetonitrilo: ácido fórmico	17
Tabela 3: Áreas dos picos dos composto identificados em três cultivares diferentes em três estados de maturação	26
Tabela 4: Áreas dos picos dos composto identificados em três cultivares diferentes em três estados de maturação tendo sido infetadas	28

Resumo

A azeitona, tem ênfase na dieta mediterrânea pois é um produto que é bastante utilizado, em forma de azeite ou na forma de azeitona de mesa. Porém esta no seu crescimento é fustigada por doenças ou pragas, uma das doenças que tem vindo a destruir produções é a antracnose da oliveira, assim este trabalho dedicou-se ao estudo dos efeitos deste fungo *Colletotrichum acutatum* em três cultivares Cobrançosa, Galega Vulgar e Picual.

O efeito deste fungo, provocou um decréscimo acentuado na composição fenólica das diferentes cultivares apresentando valores nas azeitonas não infetadas de teores de *orto*-difenois entre $12,10 \pm 0,79$ a $84,14 \pm 9,22$ mg AG g^{-1} para teores $4,20 \pm 0,49$ e $23,49 \pm 1,11$ mg AG. g^{-1} nas azeitonas infetadas, teores de fenóis entre $12,69 \pm 0,91$ a $57,23 \pm 3,47$ mg AG g^{-1} para teores $4,87 \pm 0,16$ e $25,67 \pm 2,66$ mg AG g^{-1} nas azeitonas infetadas e teores entre $8,97 \pm 0,50$ a $39,05 \pm 3,03$ mg CAT g^{-1} para teores $3,72 \pm 0,07$ e $19,66 \pm 0,83$ mg CAT g^{-1} nas infetadas. Foi igualmente estudado o comportamento das diferentes cultivares ao nível da maturação (verde, semi verde e maduro).

Por fim identificou-se por HPLC diferentes compostos dos quais o tirosol se mostrou como o maioritário, contudo a presença do fungo revelou que grande parte destes compostos são degradados. Notou-se que a cultivar Galega Vulgar foi a que teve uma maior degradação e a cultivar Picual embora tenha tido perdas nos dois primeiros estados de maturação, no último observou-se o contrário mostrando assim a capacidade de resposta ao ataque por parte do fungo.

Abstract

The olive has emphasis in the Mediterranean diet because it is a product that is widely used, in the form of olive oil or in the form of table olives. However, in its growth is affected by diseases or pests, one of the diseases that has been destroying productions is the anthracnose of the olive tree, so this work was dedicated to the study of the effects of this fungus *Colletotrichum Acutatum* in three cultivars Cobrançosa, Galega Vulgar and Picual.

The effect of this fungus caused a marked decrease in the phenolic composition of the different cultivars presenting values in the uninfected olives of ortho-diphenol contents between 12.10 ± 0.79 to 84.14 ± 9.22 mg AG g⁻¹ for contents 4.20 ± 0.49 and 23.49 ± 1.11 mg AG g⁻¹ in infected olives, phenol content between 12.69 ± 0.91 to 57.23 ± 3.47 mg AG g⁻¹ for contents 4.87 ± 0.16 and 25.67 ± 2.66 mg AG g⁻¹ in infected olives and contents between 8.97 ± 0.50 and 39.05 ± 3.03 mg CAT g⁻¹ for contents 3.72 ± 0.07 and 19.66 ± 0.83 mg CAT g⁻¹ in infected ones. The behavior of different cultivars at maturity level (green, semi-green and mature) was also studied.

Finally, it was identified by HPLC different compounds of which tyrosol was the majority, however the presence of the fungus revealed that most of these compounds are degraded. It was noted that the cultivar Galega Vulgar had the highest degradation of phenolics compounds and the cultivar Picual, although it had losses in the first two ripening states, in the latter it was observed the opposite showing thus the responsiveness.

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1. Enquadramento temático

A oliveira é uma árvore da família *Oleacea* e é a única desta família em que o seu fruto é comestível. Do seu fruto é possível retirar dois produtos, o azeite e a azeitona de mesa. No entanto, a oliveira depara-se com pragas e doenças que produzem um efeito negativo afetando a produção e a qualidade dos seus produtos.

O presente trabalho centrar-se-á numa das doenças que afetam grande parte dos olivais, a antracnose da oliveira, uma doença provocada por espécies de fungos patogénicos, da família *Colletotrichum spp.*, sendo o *Colletotrichum acutatum* a espécie predominante.

Deste modo, este estudo irá analisar o efeito da ação deste fungo na qualidade das azeitonas usadas para produção de azeites, comparando três cultivares diferentes de azeitonas: Picual, Cobrançosa e Galega Vulgar nos diferentes estados de maturação tendo estas sido previamente infetadas com o fungo (*C. acutatum*) e outras não. A utilização destas cultivares na realização deste estudo deve-se ao facto de estas apresentarem diferentes suscetibilidades ao seu ataque, onde a Galega Vulgar apresenta maior suscetível, a Cobrançosa moderadamente suscetível e a Picual resistente, procurando assim qual o fator diferenciativo a nível fenólico que possa responder a este comportamento

1.1. Introdução

A oliveira é uma árvore de tamanho médio com cerca de 4 a 8 metros de altura com grande longevidade e um crescimento lento e de folha persistente. O tronco é grosso e tortuoso com a casca em tons entre o cinzento e verde acinzentado. O sistema radicular está muito dependente da disponibilidade hídrica do solo e do arejamento do mesmo, assim este poderá atingir entre 15-80 cm de profundidade (Grave, 2013). A ramificação da oliveira está dividida em dois tipos, a ramificação primária, onde são formados os ramos principais ou de sustentação e a ramificação secundária que se forma sobre a primária e é onde se desenvolvem as flores e os frutos. Os ramos secundários formam uma copa arredondada e bastante densa sendo necessária a sua poda para a entrada de luz e arejamento que tem efeito no combate a pragas e doenças (Guerrero, 2003).

A folhagem pode ter forma oval, oblonga ou lanceolada com coloração verde escura na parte superior (adaxial) e cinzenta na parte inferior (abaxial), estas estão dispostas de forma oposto-cruzado.

A floração das oliveiras vai muito depender da região onde esta se encontra, no entanto, em termos gerais estas florescem entre o final de abril e o início de junho. As inflorescências têm lugar nas axilas foliares dos nós de crescimento vegetativo do ano anterior à floração, podendo dividir-se em dois tipos, as hermafroditas que irão dar origem ao fruto, e as estaminíferas que devido a não apresentarem ovário ou este ser rudimentar não produzem fruto. A média de inflorescência da oliveira varia entre as 10-40 flores por ramo dependendo do cultivar e de fatores ambientais e fisiológicos. Inicia o seu abrolhamento entre março e abril, com a formação de gomos axilares e de rebentos terminais. A floração que se inicia entre maio e junho dá início à polinização. Nos meses julho e agosto começa o aumento e o endurecimento do caroço e, consequentemente, a produção da polpa que irá engrossar até atingir o seu tamanho normal em função da cultivar. A partir de outubro inicia-se o amadurecimento que em algumas cultivares é observado o escurecimento do fruto. No inverno, esta entra em período de repouso invernal (Guerrero, 2003; Maria & Meneses, 2012).

A oliveira é uma das árvores cultivadas mais antigas do mundo. Sendo originária da palestina há cerca de 4000-3000 anos *a.C.*, a sua distribuição rapidamente se estendeu pelas regiões circundantes do mar mediterrâneo. A partir do século XV houve uma extensão mais

significativa, tendo esta espécie chegado a vários pontos do globo (Barranco, Fernandez-escobar, & Rallo, 2008).

Com este alastramento estima-se que, no mundo, haja cerca de 10 milhões de hectares da superfície terrestre que são ocupados por oliveiras e que exista aproximadamente 1000 milhões de oliveiras (Barranco et al., 2008).

Na Figura 1, é possível observar o desenvolvimento da produção oleica mundial com a produção oleica europeia, tendo ambos um desenvolvimento semelhante.

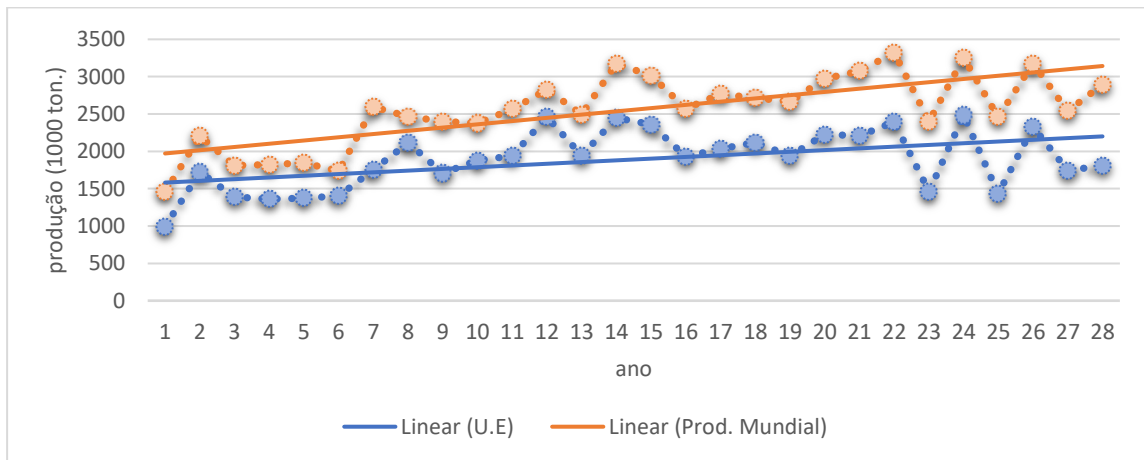


Figura 1- Comparação da produção oleica, em 1000 toneladas, entre a união europeia e a mundial

Isto deve-se ao facto de o continente europeu deter a maior produção oleica e, conseqüentemente, a maior superfície de olival do mundo, sendo a Espanha, o país detentor da maior produção, seguidos da Itália e Grécia no *ranking* mundial.

Relativamente à produção em Portugal, este ocupa o 8º lugar no *ranking* de produção (1,4% da produção mundial). Esta produção está distribuída pelas diferentes regiões do território português sendo as regiões com maior produção o Alentejo e Trás-os-Montes, das quais o Alentejo é o produtor maioritário, tanto a nível de área como de produção de azeite como se pode observar na Figura 2.

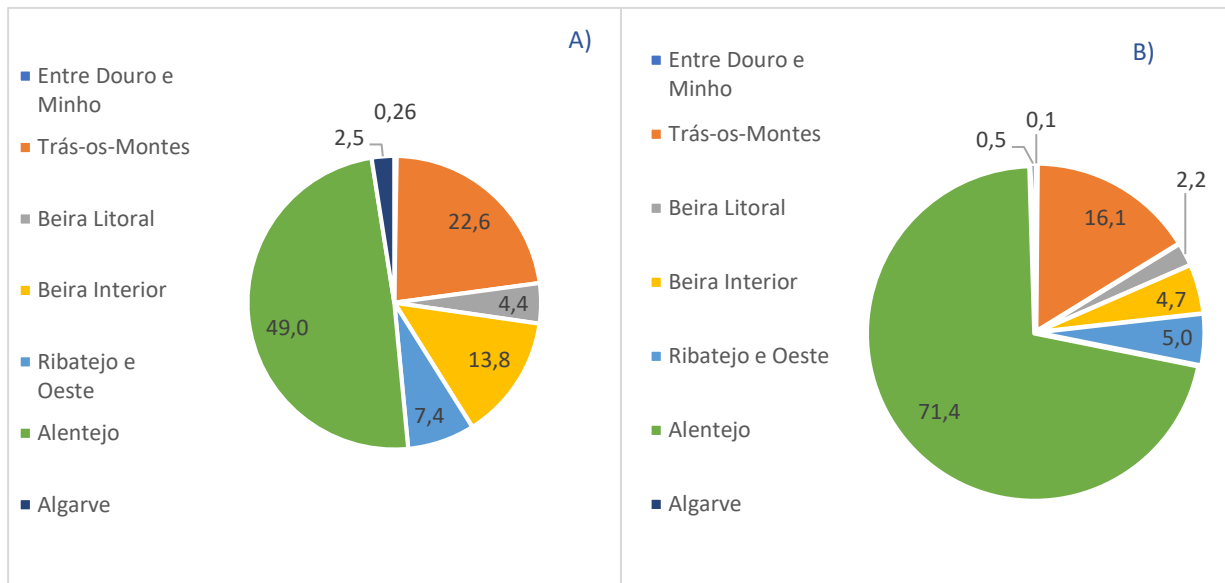


Figura 2: Representação gráfica: (A) % de área (ha) ocupada por olivais em Portugal; (B) quantidade (ton) de azeite produzido em Portugal.

Em Portugal, a cultivar mais abundante de azeitonas é a Galega Vulgar, devido à produção de azeite de alta qualidade, contudo o seu rendimento é baixo. Assim, de forma a aumentar a produção nacional de azeite, foram plantadas outras cultivares tais como Picual, Cobrançosa e Arbequina pelo facto de estas apresentarem rendimentos elevados para a extração de azeite (Grave, 2013). Muitas destas cultivares são idênticas às que se encontram nos outros países, no entanto, em Portugal, por ser um país que conjuga dois climas diferentes, clima mediterrânico, que é dado por um clima quente e seco, e o clima atlântico, que é mais húmido e fresco devido à nossa proximidade do oceano atlântico, leva a que estas apresentem diferenças na produção e na vulnerabilidade aos ataques de pragas e doenças (Oteros et al., 2013).

1.2. Fatores que influenciam a composição e qualidade da azeitona

A azeitona, fruto da oliveira, estruturalmente é denominada por uma drupa ovoide ou sub-ovoide e é composta por três estruturas:

Endocarpo (caroço) aqui nesta estrutura está presente o embrião que se encontra envolto por uma estrutura composta por lenhina que é extremamente rija que consoante a cultivar apresenta cerca de 18-22% do peso total da azeitona, neste órgão encontra-se também cerca de 22-27% de óleo.

Mesocarpo (polpa) é a estrutura de armazenamento dos vários nutrientes, tais como água, proteínas, óleos que após a maturação são reservados em estruturas celulares (vacúolos), açúcares, minerais e compostos fenólicos. Esta estrutura apresenta 70-80% do peso da azeitona.

Epicarpo (película) é a camada exterior e de proteção da azeitona. Esta película apresenta diferentes tonalidades consoante a maturação do fruto passando de verde para preto, sendo esta a última fase de maturação da azeitona. Aqui encontram-se grandes quantidades de clorofila, antocianinas e carotenoides. O seu peso varia entre 1-3% do peso total da azeitona (Barranco et al., 2008; Böhm, 2013; Grave, 2013).

Na sua composição química, a azeitona é constituída por água (60-75%), fração lipídica (10-25%), açúcares, proteínas e metabolitos secundários (Klen et al., 2014; Servili et al., 1999).

Os metabolitos secundários apresentam cerca de 1-3% do peso da azeitona e estão maioritariamente representados por quatro grandes grupos: os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides e os flavonoides que podem apresentar concentrações variadas devido a fatores intrínsecos (a cultivar) e extrínsecos (o meio ambiente, a biodisponibilidade de nutrientes e água no solo). Contudo os compostos fenólicos mais abundantes na azeitona são o hidroxitirosol, tirosol e a oleuropeína, os quais apresentam uma atividade antioxidante elevada.

O hidroxitirosol, para além da atividade antioxidante, apresenta também atividade antimicrobiana e ajuda no combate a doenças coronárias e arteriosclerose entre outras doenças, da mesma forma este apresenta mecanismos de resposta a ataques de doenças e pragas através da síntese de fitoalexinas, compostos importantes no combate aos fungos e outros mecanismos de proteção contra as doenças e pragas (Mougiou et al., 2018). Contudo, o teor deste composto, durante a maturação na árvore, tende a diminuir, mas após a colheita observa-se um aumento considerável atingindo os seus máximos, este aumento deve-se à hidrólise da oleuropeína (Mougiou et al., 2018).

A oleuropeína é o composto mais abundante na azeitona, sendo este um secoiridóides. A sua estrutura é composta por um éster heterosídico de ácido elenóico β -glucosilado e hidroxitirosol, tendo este igualmente um papel fundamental na defesa da planta pois a através da enzima β -glucosilase esta converte-se numa forte proteína desnaturante que tem poder de destruir tecidos malignos ao fruto (Mougiou et al., 2018).

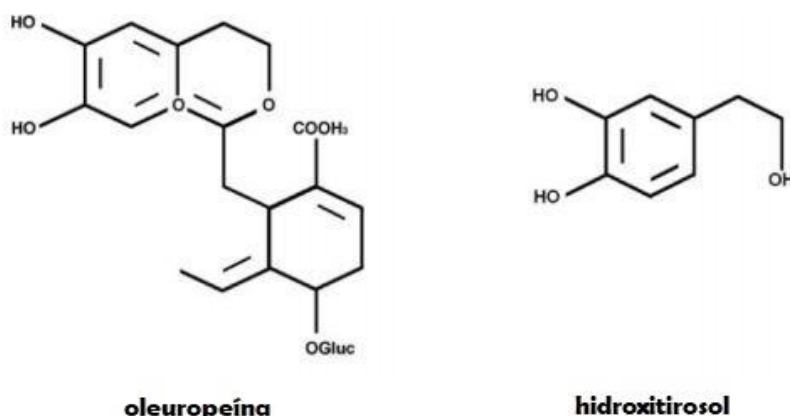


Figura 3: Estrutura química da oleuropeína e do hidroxitirosol.

1.2.1. Cultivar

Sabe-se que na bacia mediterrânica existe uma vasta população de espécies de oliveiras com uma grande variabilidade genética (Ozdemir et al., 2018; Pérez et al. 2018). Esta variabilidade genética torna-se numa mais valia para o estudo desta planta como também para a sua produção. Hoje em dia, programas de reprodução estão a ser guiados de forma a que se desenvolvam cultivares de alta qualidade, com objetivo de realçar certas características tais como produção de frutos, peso do fruto, relação polpa e caroço, formato do fruto e polpa, a nível sensorial, entre outros (Rallo et al., 2012).

Em Portugal a cultivar mais utilizada até então era a Galega Vulgar pois esta produzia azeites de boa qualidade levando a uma vasta plantação desta cultivar, contudo esta é suscetível a ataques de pragas e doenças o que fez com que os produtores optassem por outras cultivares que geneticamente são mais resistentes, como por exemplo Arbequina, Cobrançosa, Picual, Koroneiki, entre outras.

1.2.2. Maturação

Durante o desenvolvimento da azeitona, esta passa por diferentes fases de maturação onde ocorrem alterações fisiológicas, bioquímicas, metabólicas e enzimáticas. Este desenvolvimento é caracterizado por um rápido crescimento na fase inicial, observando-se um decréscimo seguido de um aumento no crescimento (Morelló et al., 2005). Devido a estas alterações, Uceda

& Hermoso, (1998) criaram um método qualitativo, o Índice de Maturação (IM), para facilitar aos produtores a categorização das azeitonas. Este método atribui uma classificação numérica (0 - 7) nos diferentes estados de maturação que é determinada através da coloração da película e da polpa, sendo que o 0 representa uma coloração verde intensa e o 7 uma coloração negra na película e roxa na polpa como apresenta a Figura 4.



Figura 4: Índice de maturação: 0, película totalmente verde; 1, película verde amarelada; 2, coloração esverdeada com vermelho pela metade; 3, coloração avermelhada ou purpuras; 4, película preta com polpa branca; 5, película preta com polpa meio purpura; 6, película preta com polpa quase toda roxa; 7, película preta com polpa totalmente roxa (adaptado: Gouvinhas,2016).

Em termos de composição fenólica a maturação tem um fator determinante na quantidade de compostos fenólicos. Assim observa-se que no decorrer da maturação os valores destes compostos oscilam sendo máximos num estado de maturação médio (IM= 3;4), seguindo-se de uma diminuição até seu estado maduro (Amiot et al., 1986).

A maturação da azeitona não é idêntica pois existe vários fatores que influenciam, tais como a área geográfica de cultivo, a cultivar, a disponibilidade de água e de minerais, a temperatura e as práticas agrícolas, o que afeta a composição fenólica da azeitona (Amiot et al., 1986; Gouvinhas, 2016).

1.2.3. Doenças da oliveira

A oliveira, pertencendo ao reino vegetal, partilha consigo vários fatores bióticos e abióticos, os quais, quando alterados, devido por exemplo a climas adversos, como um verão chuvoso, ou quando o ataque de pragas ou doenças, estes provocam efeitos negativos na sua produção e qualidade tornando-se necessário medidas para minimizar ou eliminar estes fatores (Condeet al., 2014). No entanto, o combate ainda é muito rudimentar estando restringido principalmente

a boas práticas agrícolas (podas, limpeza de ramos secos, utilização de ferramentas que não estejam infetadas) e uso de alguns fitofármacos, sendo que a nível europeu a utilização de fitofármacos em olivais é demasiado restrita (Barranco et al., 2008; Moral et al., 2008).

Como existem centenas de pragas e doenças, este trabalho irá centrar o seu estudo na antracnose da oliveira, também denominada por “gafa”, uma doença provocada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* que ataca os olivais afetando a qualidade da produção.

1.2.3.1. Antracnose da oliveira

A antracnose da oliveira é uma doença provocada por fungos patogénicos, *Colletotrichum spp.*, sendo o *Colletotrichum acutatum* a espécie predominante (Juan Moral et al., 2008). Esta doença encontra-se distribuída por diversos olivais em diferentes regiões do planeta. Contudo devido às condições ambientais, suscetibilidade da cultivar e à virulência do patogénico, as regiões a sul de Portugal e algumas regiões de Itália são atacadas mais severamente por esta doença (Barranco et al., 2008).

A antracnose quando infeta a azeitona, faz com que esta adquira um aspeto mucilaginoso alaranjado de conídios, que no decorrer da maturação apresentará uma estrutura mumificada acabando assim por cair como refere Talhinhos et al. (2003). Contudo, a proliferação deste fungo pode chegar a outras estruturas da planta assim como folhas e ramos provocando a desfolhação e a morte dos ramos. Esta doença tem um elevado desenvolvimento quando as condições de humidade do meio (>90%) e temperatura (10-30° C) se encontram favoráveis sendo por esta razão que em olivais de grande área e bastante densos o alastramento da doença seja mais rápido, assim como a presença de brisas em épocas de grande humidade, que é bastante frequente na bacia mediterrânea, o fator de propagação do fungo é bastante maior (Juan Moral et al., 2008; Talhinhos et al., 2018).

O ciclo de vida do *Colletotrichum acutatum* ainda não está bem fundamentado. Contudo sabe-se que o ataque deste fungo é praticamente idêntico ao que acontece em outras plantas, onde inicialmente existe uma adesão à superfície do organismo hospedeiro, a conídea germina, existe um desenvolvimento do appressorium que se diferencia formando estruturas para penetração no hospedeiro para chegar até a cutícula e por fim existe um crescimento e colonização nos tecidos do hospedeiro (Gomes et al., 2009). Após o ataque, o fungo produzirá toxinas que irão

influenciar a qualidade da azeitona a nível físico-químico (Gomes et al., 2009; Juan Moral et al., 2008).

A interação entre o fungo e o hospede, pode caracterizar-se por uma infeção do fungo através da colonização da totalidade dos tecidos da azeitona, sendo que o estado avançado de maturação da azeitona e a presença de feridas, geralmente provocadas pela mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*) propicia a proliferação mais rapidamente. Ou pode caracterizar-se pela resistência da planta ao fungo, os quais podem ser a incapacidade da enzima do fungo não conseguir colonizar o fruto ainda verde, devido a este não apresentar na sua constituição um substrato ideal para a sobrevivência do fungo ou pela produção de fitoalexinas, composto tóxicos, que inibem o desenvolvimento e propagação do fungo, o que leva a que certas cultivares se tornem mais ou menos suscetíveis ao fungo (J Moral & Trapero, 2009; Wharton, Phillip S, 2004).

1.3. Combate e controlo da antracnose

Devido a produção olivícola ser uma produção biológica, faz com que o combate desta doença seja feito por medidas agrícolas. Por este motivo, a ventilação das oliveiras, que previne a criação de ambientes húmidos, a colheita dos frutos que se encontram atacados pelo fungo, o adiantamento da colheita dos frutos, o uso de fungicidas com compostos cúpricos, a plantação de cultivares mais resistentes a doenças ou de colheita tardia e até mesmo a correção do solo são métodos de controlo da doença.

A tolerância ao patógeno está classificada como resistente, resistência moderada e suscetível, sendo que esta classificação é baseada em informação empírica da observação no terreno e por estudos realizados pelos próprios olivicultores na sua produção. No entanto, o estudo realizado por Gomes et al., (2009) afirma cultivares como Picual e Cobrançosa, em que a sua colheita é tardia, leva a que sejam resistentes devido a haver ainda uma elevada concentração de compostos fenólicos, o que não acontece com a cultivar Galega Vulgar que se torna suscetível pois ao amadurecer mais cedo denota-se um decréscimo dos compostos fenólicos tornando-se ideal ao ataque do fungo.

1.4. Cromatografia e espectroscopia para análise da composição da azeitona

O conhecimento adquirido até aos dias de hoje da composição fenólica da azeitona, como também de outros frutos, deveu-se á utilização de uma vasta gama de métodos e técnicas analíticas, entre as quais podemos enumerar: metodologias de espectrofotometria; cromatografia de gás (GC); cromatografia líquida (LC) acoplada com ultravioletas (UV) e detetor de matriz de foto díodo; espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR); espectrometria de massa (MS), entre outros.

As variadas metodologias apresentam funções distintas entre si, contudo elas complementam-se apresentando várias vantagens para a análise, exemplo disso é a capacidade de identificar numa matriz alimentar complexa os diferentes compostos aí presentes com o uso conjugado da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade).

Mas estes progressos só foram possíveis pela necessidade de ultrapassar os fatores limitantes das técnicas de espectrofotometria, o caso de colorimetria entre outros. Estas técnicas são baratas e rápidas, contudo apresentam erros significativos na quantificação dos compostos e a sua qualidade é bastante fraca.

1.4.1. *High Performance Liquid Chromatography*

O *HPLC* é um método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizada na separação de vários compostos de uma mistura de substâncias, tendo como objetivo identificá-los, quantificá-los e até mesmo purificá-los.

Esta técnica é baseada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, através de interações do analito e as duas fases móvel/estacionária.

Desta forma, o processo compreende que a fase móvel, denominada de eluente, atravesse continuamente a fase estacionária. Assim deste modo as moléculas da mistura vão ser distribuídas diferencialmente entre as fases, pois a fase estacionária apresenta carga contrária que a fase móvel e fazendo com que os analitos que apresentem maior interação com esta fase sejam retidos, isto é a sua deslocação através da coluna é mais lenta. A quantificação é feita no final da coluna, onde existe um detetor que através de um diferencial de concentração ele cria

um sinal que será registado num cromatograma. Contudo é necessário perceber que para a análise por este método baseia-se na solubilidade dos analitos, tendo que estes serem solúveis na fase móvel (Gouvinhas et al., 2015; Ramos et al., 2014).

Este método apresenta vantagens como, tempos reduzidos de análise, capacidade de efetuar análises qualitativas como quantitativas, ser reprodutível e ser um método automatizado colmatando assim muitas limitações dos métodos colorimétricos. No entanto ele apresenta desvantagens tais como, a instrumentação é de alto custo, esta associado uma alto custo de operação, é necessária experiência qualificada e esta também associada uma baixa sensibilidade perante alguns compostos (Alves, 2013; Gouvinhas, 2016).

Porém existem variadas alternativas para melhorar o seu desempenho através do acoplamento de instrumentos específicos como espectrómetro de massas (MS), o de fluorescência, índice de refração (IR), fotodiodo (DAD) entre outros. Neste trabalho será usado o HPLC- DAD para análise de compostos fenólicos pois este tem a vantagem de ser mais sensível e não sofre variações com a temperatura.

1.5. Objetivos

Tendo em consideração todos os pressupostos anteriormente referidos relativamente aos fatores que influenciam a composição e a qualidade da azeitona, o objetivo deste trabalho foi a análise da composição fenólica e da atividade antioxidante em azeitonas de três cultivares com diferentes suscetibilidades ao ataque do fungo, *Colletotrichum acutatum* de forma a contribuir para o conhecimento de como o fungo afeta a qualidade da azeitona, direcionada para a produção de azeite.

Assim o estudo incidiu na análise da composição fenólica da azeitona de três cultivares em diferentes estados de maturação, sendo que umas foram expostas ao ataque do fungo *Colletotrichum acutatum* e outras não (estas consideradas controlo).

Foi ainda objeto de estudo a quantificação da composição fenólica por HPLC da azeitona de três cultivares infetadas e não infetadas nos três estados de maturação.

Capítulo 2: Material e Métodos

2.1. Amostragem

Neste trabalho foram usadas azeitonas de três cultivares (Cobrançosa, Galega Vulgar e Picual) provenientes de um olival certificado do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, Elvas, Portugal; GPS: 38°54'53.35" N, 7°19'11.06" W) no ano de colheita de 2017/2018.

As azeitonas foram colhidas em três estados de maturação (verde, semi verde e maduro), sendo que apenas foram colhidas as azeitonas sãs, isto é, sem quaisquer sinais de doença e/ou feridas. As datas de colheita, índices de maturação e respetivas designações das amostras estão representados na Tabela 1. Após a colheita, e para o estudo da infeção pelo *C. acutatum*, as azeitonas (nos três estados de maturação) foram inoculadas separadamente com uma suspensão de esporos de *C. acutatum* (10^7 UFC) e foram mantidas em câmara húmida e fotoperíodo de 12h de luz durante 12 dias à temperatura de 23-25°C. Após este período, as amostras foram imediatamente armazenadas em câmaras de ultracongelação a -85°C até posteriores análises. Para as amostras controlo, foi utilizado o mesmo procedimento, exceto a pulverização que foi efetuada com água destilada esterilizada.

Tabela 1: Designação dos códigos das amostras nos diferentes estados de maturação e data de colheita

Cultivar	Estado maturação (n=3)	Data de colheita	Código	
			Não infetado	Infetado
Cobrançosa	Verde	3/10/2017	CobV	
				CobVI
	Semi verde	30/10/2017	CobSV	
				CobSVI
	Maduro	9/11/2017	CobM	
				CobMI
Galega Vulgar	Verde	27/10/2017	GalV	
				GalVI
	Semi verde	27/10/2017	GalSV	
				GalSVI
	Maduro	30/10/2017	GalM	
				GalMI
Picual	Verde	31/10/2017	PicV	
				PicVI
	Semi verde	3/11/2017	PicSV	
				PicSVI
	Maduro	10/11/2017	PicM	
				PicMI

2.2. Determinação do teor em fenóis totais

Nesta determinação foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia exposta por Sousa et al. (2014).

O reagente Folin-Ciocalteu é formado por uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMO_{12}O_{40}$), que apresenta em meio alcalino uma coloração amarela. Devido à presença de agentes redutores e compostos fenólicos são originados óxidos de molibdénio (Mo_8O_{23}) e tungsténio (W_8O_{23}). Esta reação de redução tem como consequência a formação de complexos azuis, que irá depois ser quantificada no espectrofotómetro a 750 nm (Magalhães et al., 2008).

Preparou-se então o carbonato de sódio (7,5%) e as soluções de ácido gálico com diferentes concentrações: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mgL^{-1} , conforme descrito em Sousa et al. (2014).

Foi adicionado a cada poço 20 μL das soluções padrão e das respetivas amostras, de seguida adicionou-se 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 80 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3), completando um volume total de 200 μL . A reação foi depois incubada a 40 °C, protegida da luz durante 30 minutos. A absorvância foi lida com um comprimento de onda de 750 nm, no leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal), permitindo obter as seguintes retas de calibração ($y = 0,0056x + 0,0739$, $R^2 = 0,9965$ e $y = 0,0065x + 0,0691$, $R^2 = 0,999$).

A partir da equação da reta por interpolação, foi calculado o teor em fenóis totais, sendo os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra ($mg\ AG\ g^{-1}$). Tanto as soluções padrão como as amostras foram analisadas em triplicado.

2.3. Determinação do teor em *orto*-difenóis

O conteúdo em *orto*-difenóis foi determinado colorimetricamente pelo método adaptado por Gouvinhas et al., (2015). Baseia-se na complexação dos *orto*-difenóis em iões de molibdato, originando uma cor alaranjada.

Inicialmente foi preparado os padrões de ácido gálico em água destilada a diferentes concentrações 5.0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200.0 mgL⁻¹ e de molibdato de sódio para a construção da reta de calibração.

Assim para a determinação dos *orto*-difenóis adicionou-se numa microplaca 160 µL da amostra e da solução padrão, posteriormente adicionou-se 40 µL de molibdato de sódio, depois incubou-se por cerca de 15 min, protegido da luz e a temperatura ambiente, lendo se posteriormente a absorvência a 375nm num espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal), obtendo as reta de calibração ($y=0,0061x+0,0479$, $R^2=0,9995$; $y=0,0057x+0,0994$, $R^2=0,999$) por interpolação, foi calculado o teor em *orto*-difenóis, sendo os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra (mg AG g⁻¹). Tanto as soluções padrão como as amostras foram analisadas em triplicado.

2.4. Determinação do teor em flavonoides

O teor em flavonóides foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Zhishen et al.(1999). Preparou-se o cloreto de alumínio a 100 gL⁻¹, o nitrito de sódio a 50 gL⁻¹, o hidróxido de sódio a 1 M e os padrões de catequina com diferentes concentrações: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mg L⁻¹.

Adicionou-se a cada poço 24 µL de cada solução padrão e amostra, e 28 µL de nitrito de sódio (NaNO₂). Aguardou-se 5 minutos à temperatura ambiente, e de seguida adicionou-se 28 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃). Deixou-se repousar de novo 6 minutos, e por fim adicionou-se 120 µL de hidróxido de sódio (NaOH, 1 M). Foi então lida a absorvência da mistura com um comprimento de onda de 510 nm, e com um tempo de agitação de 30 segundos, no leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal).

A partir destas absorvências foi obtida uma reta de calibração ($y = 0,0017x + 0,0424$) com $R^2 = 0,9989$.

A partir da equação da reta por interpolação, foi calculado o teor em flavonóides, sendo os resultados expressos em miligramas de catequina por grama de amostra (mg CAT g⁻¹). Tanto as soluções padrão como as amostras foram analisadas em triplicado.

2.5. Determinação da atividade antioxidante (ABTS)

Neste método é adicionado ao ABTS persulfato de potássio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), oxidando-o em $\text{ABTS}\cdot+$, originando uma cor verde azulada escura. Quando a esta mistura é adicionada antioxidantes, o catião é reduzido a ABTS, e observa-se uma descoloração quando comparada à solução inicial (Mena et al., 2011)

Deu-se início a este método preparando-se o catião radical $\text{ABTS}\cdot+$, a partir de uma solução de ABTS a 7 mM (em água) e uma solução de persulfato de potássio a 148 mM. De seguida, adicionou-se 88 μL da solução de persulfato de potássio a 5 ml da solução ABTS, deixando esta mistura em repouso durante 12-16 horas protegida da luz e à temperatura ambiente, para que neste período de tempo atingisse o seu estado oxidativo estável. No final deste período, preparou-se a solução de trabalho, através da diluição da solução $\text{ABTS}\cdot+$ a 100 mM em tampão de acetato de sódio (pH = 4,5), até se obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,02$, a um comprimento de onda de 734 nm.

Para a solução padrão foi utilizado o Trolox, tendo sido preparado por diluição da solução 5 mM em tampão acetato de sódio. Posteriormente, esta solução foi diluída 1:5 (v/v) em tampão de acetato de sódio, obtendo-se uma solução de Trolox com 0,2 mM. A partir desta, fizeram-se várias diluições em tampão acetato de sódio, obtendo-se diferentes concentrações: 0,140; 0,098; 0,069; 0,048; 0,034 mM. Como resultado final teremos uma reta padrão que servirá para determinar a capacidade de captação de radicais livres dos extratos polifenóis.

Para avaliar a percentagem de inibição, começamos por adicionar 188 μL da solução de trabalho de $\text{ABTS}\cdot+$, de seguida adiciona-se 12 μL de cada solução padrão ou amostra, completando um volume de 200 μL . É incluída também uma solução com 188 μL de ABTS + 12 μL de água destilada, que servirá como branco. A reação foi depois incubada à temperatura ambiente e protegida da luz durante 30 minutos, sendo feita a leitura da absorvância a 734 nm. Obtemos assim uma reta ($y=236,55x+0,2848$; $R^2=0,9971$).

Para o cálculo da percentagem de inibição e do TEAC e utilizaram as seguintes fórmulas:

1º

$$\% \text{ inibição}_{\text{amostra}} = 100 \times (\text{Abs}_{734\text{ABTS Branco}} - \text{Abs}_{734\text{amostra}}) / \text{Abs}_{734\text{ABTS Branco}}$$

2º

$$TEAC_{amostra} = \% \text{ inibição} / a$$

(a é o declive da reta ($y=ax$))

expressando em mmoles de Trolox por grama ($\text{mmol Trolox g}^{-1}$). Tanto as soluções padrão como as amostras foram analisadas em triplicado.

2.6. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC

A análise por HPLC foi efetuada com equipamento Thermo Finnigan Surveyor equipado com um detetor de díodo.

A separação de compostos foi feita com uma coluna ACE UltraCore $5\mu\text{m SuperC18}$ ($250 \times 4,6\text{mm}$, id) a $25\text{ }^\circ\text{C}$, estando instalada uma pré-coluna com o mesmo tipo de enchimento. As amostras foram injetadas utilizando um loop de $20\ \mu\text{L}$. A fase móvel apolar composta pelos solventes A – $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$ (água: ácido fórmico - 99,9:0,1) e solvente B – $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{CH}_2\text{O}_2$ (acetonitrilo: ácido fórmico - 99,9:0,1) e uma fase estacionária que está no interior da coluna, com características polares. Uma vez que as fases móveis são apolares, o tempo de retenção dos eluentes polares será maior que o do eluentes polares, eluindo estes últimos mais rápido. O programa de eluentes foi aplicado de acordo com o descrito na tabela abaixo

Tabela 2: Programa de eluentes; (A)- água: ácido fórmico, (B)- acetonitrilo: ácido fórmico

Tempo de análise (min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	90	10
40	74	26
70	35	65
71	0	100
75	0	100
76	90	10
85	90	10

A detecção com o DAD foi efetuada entre 200-600nm selecionados de acordo com os compostos a analisar.

A análise foi realizada a 25°C, com um volume de amostra injetado de 20 µL e um fluxo de 1mL/min. As amostras foram injetadas em duplicado.

Nesta análise foi utilizado um sistema de HPLC Thermo Finnigan Surveyor com bomba quaternária, autosampler e detetor de PDA (*photo diode-array*) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). Para a identificação dos compostos fenólicos foram usados os padrões com os respetivos tempos de retenção, ordens de eluição, espetros UV e a literatura (Anastasiadi et al., 2012; Barros et al., 2014; Dias et al., 2015; Talhaoui et al., 2014).

2.7. Análise estatística

Os dados foram sujeitos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de intervalos múltiplos de Tukey, usando o IBM SPSS statistics 2.1 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) utilizando um nível de confiança de $P < 0.05$.

Capítulo 3: Resultados e discussão

3.1 Composição fenólica de azeitonas

Na Figura 5 (pag.23) estão representados os resultados relativos à composição fenólica das azeitonas de 3 cultivares em três estados de maturação, estando estas infetadas e não infetadas.

De um modo geral é possível observar o mesmo perfil para os diferentes parâmetros em estudo para cada uma das cultivares, no entanto, verificam-se diferenças significativas ($p < 0.005$) entre elas.

Relativamente ao estudo da maturação, a cultivar Picual, de uma forma geral apresenta maior concentração de compostos fenólicos quando comparadas com as outras cultivares. Verifica-se um aumento entre os diferentes estados de maturação para todos os parâmetros analisados, *orto*-difenóis de $49,95 \pm 2,13$ a $84,14 \pm 9,22$ mg AG g^{-1} , fenóis totais de $27,02 \pm 2,25$ a $41,07 \pm 4,20$ mg AG g^{-1} e flavonoides de $23,07 \pm 0,68$ a $29,34 \pm 3,19$ mg AG g^{-1} , comparando estes resultados com o descrito na literatura verifica-se que estes valores não são coincidentes, visto que com o amadurecimento das azeitonas existe um decréscimo da composição fenólica (Gomes et al., 2009). No entanto vários autores afirmam que os teores de metabolitos secundários estão intrinsecamente relacionados com a cultivar da oliveira e por este motivo ao observarmos o comportamento desta cultivar, verifica-se que, por ser uma cultivar de colheita tardia, pressupõe que o seu amadurecimento seja mais lento, assim por este motivo os valores aqui apresentados podem não representar o estado de maturação maduro (Amiot, et al., 1986; Gouvinhas, 2016; Nieto, et al., 2010).

Na cultivar Cobrançosa verifica-se que existe um aumento na sua fase semi verde nas diferentes análises, sendo este em *orto*-difenóis de $45,52 \pm 1,56$ mg AG g^{-1} , fenóis totais de $57,23 \pm 3,47$ mg AG g^{-1} e flavonoides de $39,05 \pm 3,03$ mg CAT g^{-1} , o que se torna incongruente com o descrito na literatura, contudo o aparecimento deste pico na sua fase semi-verde pode dever-se a um possível ataque por parte de outras pragas o que leva a que a oliveira produza mais agentes de defesa.

E por último a Galega Vulgar que apresenta valores de compostos fenólicos mais baixos em comparação às cultivares anteriores, sustentando a afirmação que esta cultivar apresenta uma menor resistência ao fungo, tornando-a suscetível, facto que também se encontra descrito em estudos referenciados na literatura (Gouvinhas, Martins-Lopes, Carvalho, Barros, & Gomes, 2019).

Em comparação com os resultados de outros trabalhos descritos na literatura, estes apresentam teores superiores as cultivares apresentadas neste estudo. Possivelmente, isto deve-se à existência de diversos fatores que influenciam a produção de metabolitos secundários por parte da planta, nomeadamente a biodisponibilidade de nutrientes no solo e água, os efeitos climáticos, as práticas agrícolas, a localização geográfica entre outros fatores externos (Gouvinhas et al., 2019; Nieto et al., 2010; Vinha et al., 2005).

Relativamente ao comportamento, das azeitonas quando são infetadas estas apresentam valores inferiores às azeitonas não infetadas, observando-se teores que variam entre $4,20 \pm 0,49$ e $23,49 \pm 1,11$ mg AG g⁻¹ para os *orto*-difenóis, $4,87 \pm 0,16$ e $25,67 \pm 2,66$ mg AG g⁻¹ nos fenóis totais e nos flavonoides entre $3,72 \pm 0,07$ e $19,66 \pm 0,83$ mg CAT g⁻¹, já nas azeitonas não infetadas os valores variam de $12,10 \pm 0,79$ a $84,14 \pm 9,22$ mg AG g⁻¹ para os *orto*-difenóis, $12,69 \pm 0,91$ a $57,23 \pm 3,47$ mg AG g⁻¹ para os fenóis totais e para os flavonoides $8,97 \pm 0,50$ a $39,05 \pm 3,03$ mg CAT g⁻¹. Podendo afirmar que o ataque deste fungo contribui para um decréscimo dos metabolitos secundários na azeitona.

Analisando cultivar a cultivar, verifica-se que na Cobrançosa a maior concentração em *orto*-difenóis ($23,49 \pm 1,11$ mg AG g⁻¹), fenóis totais ($25,67 \pm 2,66$ mg AG g⁻¹) e flavonoides ($19,66 \pm 0,83$ mg CAT g⁻¹) é no estado de maturação verde, o que aponta para uma certa resistência ao ataque deste fungo, o que nos prova que a afirmação de Wharton, et al., (2004), que diz que em frutos verdes o ataque não é tao impactante, devido à produção de fitoalexinas, compostos tóxicos para o fungo, produzidos pela degradação do hidroxitirosol, que é sustentada por estes resultados.

Na Galega Vulgar, após o ataque do *Colletotrichum acutatum* houve uma diminuição dos compostos fenólicos relativamente às não infetadas, em que nos estados verde e semi verde, com $4,20 \pm 0,49$ e $4,58 \pm 0,19$ mg AG g⁻¹ em *orto*-difenóis, $4,87 \pm 0,16$ e $5,43 \pm 0,54$ mg AG g⁻¹ em fenóis totais e $3,72 \pm 0,07$ e $3,84 \pm 0,43$ mg CAT g⁻¹ em flavonoides, não apresentando diferenças significativas entre si.

A cultivar Picual apresenta diferenças significativas entre as azeitonas infetadas e não infetadas ($P < 0.005$), sendo que as diferenças mais acentuadas se verificam para os flavonoides e para os *orto*-difenóis, como se pode observar na Figura 5. Assim as azeitonas infetadas mostram que esta cultivar é mais afetada no estado maduro, por sua vez no estado de maturação semi verde os teores nas diferentes análises são mais elevados, o que nos diz que o momento ideal para a

colheita desta cultivar quando infetada deverá ser no estado de maturação semi verde pois os teores de compostos fenólicos são mais elevados, contudo é visível que com o decorrer da maturação a azeitona, além de perder os compostos fenólicos, começa a perder material orgânico devido ao ataque do fungo, o que leva a que a extração de azeite seja menor (J. Moral, Bouhmidi, & Trapero, 2008).

Com isto, vemos que os valores significativamente baixos das azeitonas infetadas pressupõem que após a incubação do fungo durante 12 dias, as azeitonas tendem a apresentar baixos valores de metabolitos secundários que vai de encontro aos resultados de Moral et al.,(2008), que afirmam que após o sétimo dia de infeção a azeitona, em qualquer dos estados de maturação, começa a apresentar conídeas e aspeto mucilaginoso havendo perdas de material orgânico.

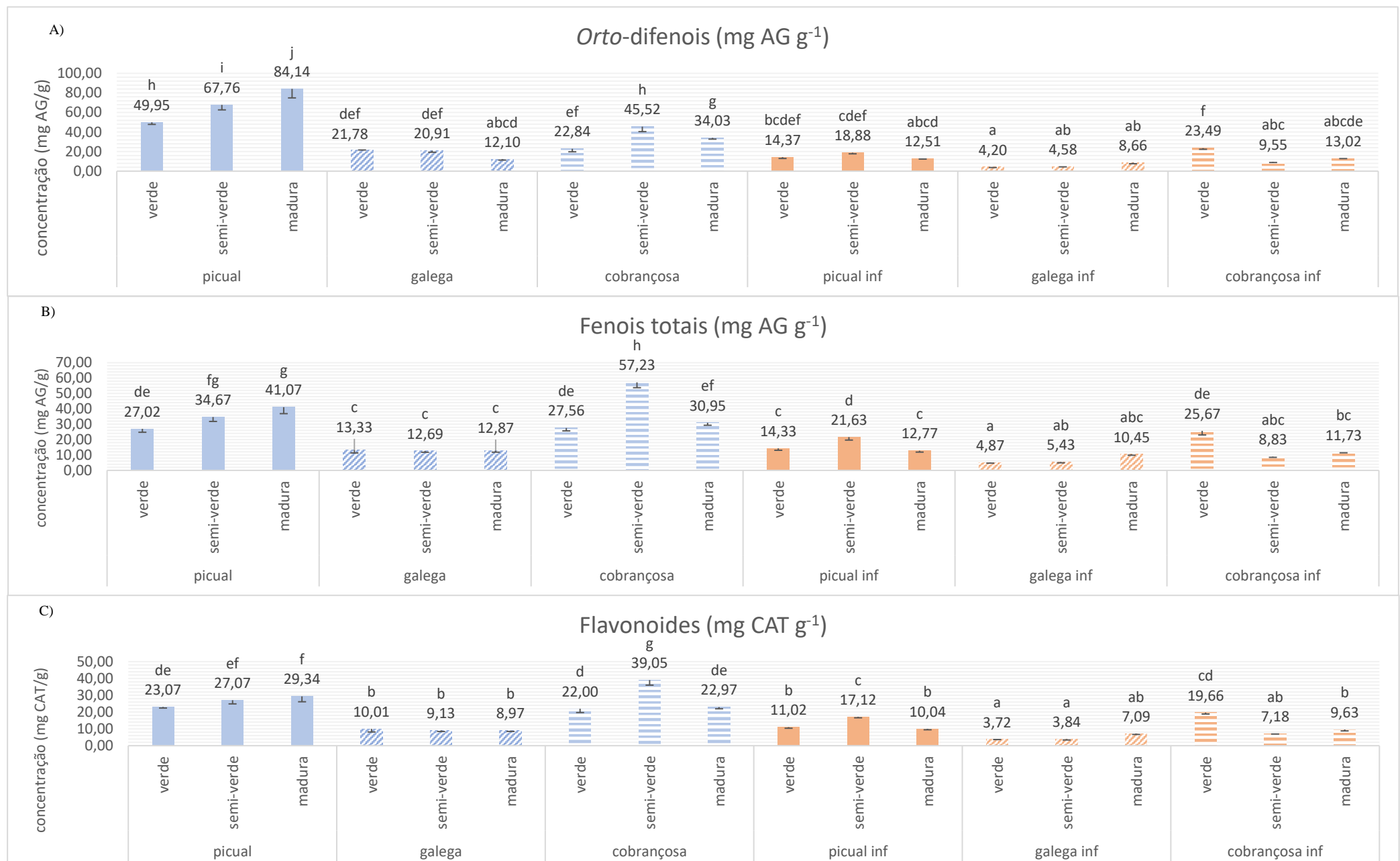


Figura 5: Representação gráfica dos teores em; A) orto-difenóis em que as médias (n=3) são apresentadas em mg AG g⁻¹; B) Fenóis totais em que as médias (n=3) são apresentadas em mg AG g⁻¹; C) Flavonoides em que as médias (n=3) são apresentadas em mg CAT g⁻¹.

Os valores apresentados são as Médias ± DP (n=3) para cada amostra. Letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes (ANOVA, P>0,05), de acordo com o teste de Tukey.

3.2 Atividade antioxidante

Relativamente à atividade antioxidante, os resultados referentes ao método de ABTS estão apresentados na Figura 6, sendo que a capacidade antioxidante varia entre $0,45 \pm 0,02$ e $2,08 \pm 0,12$ mM Trolox g^{-1} para as azeitonas sãs e entre $0,14 \pm 0,01$ e $0,74 \pm 0,08$ mM Trolox g^{-1} para as amostras infetadas, sendo possível ainda observar que existe igualmente um decréscimo com o ataque do fungo, tal como aconteceu com a determinação dos compostos fenólicos. Podemos ver ainda que o comportamento das cultivares no teste do ABTS, Figura 6, é próximo do comportamento dos fenóis totais e flavonoides anteriormente referidos, Figura 5, para as diferentes cultivares.

Relativamente às azeitonas sãs, o valor mais elevado é o da Cobrançosa com $2,08 \pm 0,12$ mM Trolox g^{-1} no estado semi verde, seguindo-se da Picual que apresenta atividade antioxidante mais elevada no estado maduro $1,50 \pm 0,11$ mM Trolox g^{-1}) e a Galega Vulgar a qual não apresenta diferenças significativas entre si.

Embora não seja possível comparar estes resultados com a literatura devido ao facto de que existem diversos fatores diferenciativos, nomeadamente, o tipo de solventes de extração, os métodos de extração ou ainda os diferentes protocolos para a determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS, no entanto vemos que os resultados seguem uma tendência idêntica ao dados analisados anteriormente comprovando que o fator antioxidante esta intrinsecamente associado à composição fenólica. (Pérez et al., 2018; Silva Monteiro, n.d.).

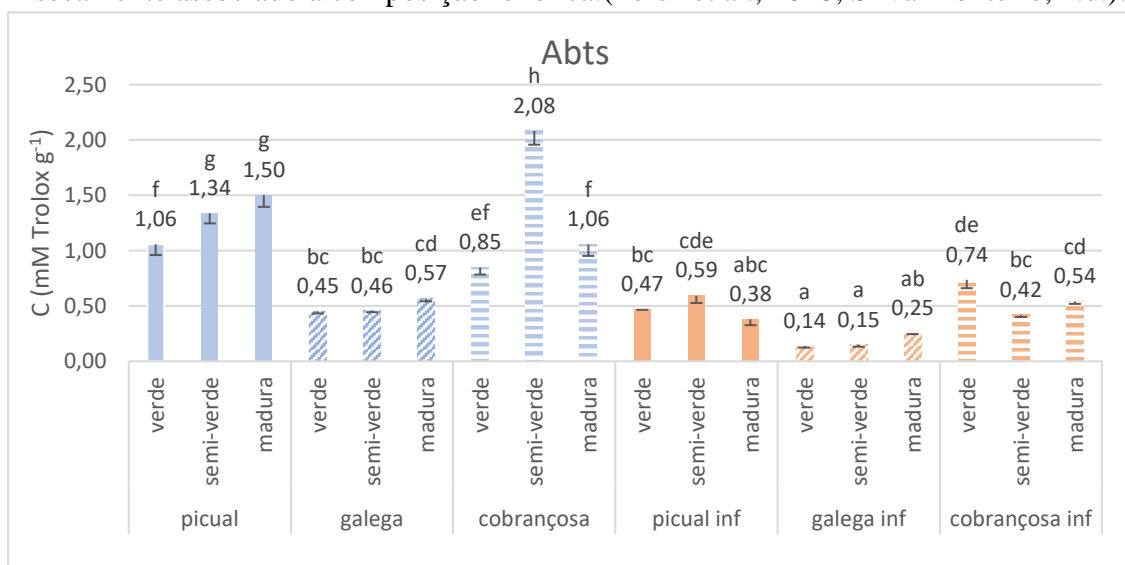


Figura 6: Gráfico da atividade antioxidante pelo método de ABTS; os valores apresentados são valores das médias ($n=3$) para cada amostra em cima estão apresentadas letras que ao não serem conectadas com a mesma letra são significativamente diferentes.

3.3 Análise cromatográfica das azeitonas

Em relação à identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC as tabelas 3 e 4 mostra-nos as áreas absolutas dos picos de cada composto nos diferentes estados de maturação, em azeitonas infetadas e não infetadas.

Neste estudo foram identificados diversos compostos sendo eles, tirosol, o ácido siríngico, compostos da família dos ácidos benzóicos, a rutina, o ácido ferúlico, luteolina-7-*O*-glucósido, compostos da família dos estilbenos, a oleuropeína, compostos da família dos secoiridóides, tendo esta identificação cruzada com o que está presente na literatura (Alves, 2013; Morelló et al., 2005; Romani, Mulinacci, Pinelli, Vincieri, & Cimato, 1999; Vinha et al., 2005). Assim para o estudo ser mais coerente a análise irá ser dividida em duas partes, uma relativa ao estudo da influência do estado da maturação e outra relativa ao estudo da influência do ataque do fungo.

3.3.1 Influência do estado de maturação

O estado de maturação tem um fator importante na composição fenólica das azeitonas sofrendo variações durante o seu desenvolvimento, como já vimos anteriormente. Assim este estudo da maturação irá centrar-se somente nas azeitonas não infetadas, com objetivo de observar o comportamento dos compostos durante as três fases de maturação (tabela 3).

Tabela 3: Áreas dos picos dos compostos identificados nas diferentes cultivares em três estados de maturação.

Composto	TR (min)	Cobrançosa			Galega Vulgar			Picual		
		Verde	Semi Verde	Madura	Verde	Semi Verde	Madura	Verde	Semi Verde	Madura
Tirosol	14	1206982	582686	1112472	3045021	1259047	1536074	1560421	1111384	1037090
Ácido. Siringico	17	277971	182021	265557	263148	99424	50432	N.I	N.I	N.I
Ácido Benzóico N.I	17,9	N.I	N.I	N.I	419013	301849	269645	270111	268157	401853
	18,4	N.I	N.I	N.I	377535	289925	347434	281452	247263	281971
Rutina	24	483698	348367	347700	441180	138568	195536	628663	447434	674914
Ácido. Ferúlico	24,5	315033	712840	167590	961878	86508	11205	288733	29561	312037
Luteolina-7-O-glucósido	24,8	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	281513	197777	1033265
Estilbenos N.I	27,7	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	1330821	1196579	1087863
Oleuropeína	28	214699	198716	277331	259420	10622	3890	N.I	N.I	N.I
Secoiridóides N.I	29	266155	167663	50799	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I

TR- Tempo de retenção; N.I- Não identificado; os picos foram identificados a um comprimento de onda de 280nm

Assim analisando a tabela 3, vemos que para cada cultivar existe compostos comuns entre ambas que são o tirosol, a rutina e o ácido ferúlico, este compostos estão comprovados pela literatura que são compostos frequentes em todas as cultivares(Vinha et al., 2005).

Desta maneira temos que na cultivar Cobrançosa, verificou-se que os compostos do estado verde para o semi verde apresentam um decréscimo nas suas áreas, excetuando o ácido ferúlico que aumentou tornando-se o composto mais elevado no estado semi verde, que comparando com as análises que se fizeram anteriormente podemos apontar que este tenha sido o composto influenciador da elevada atividade antioxidante. Na continuação da maturação volta a haver um aumento dos picos dos compostos tirosol, ácido siringico e oleuropeína, sendo que este último aumenta no final da maturação que poderá estar associado à conjugação de compostos a partir de outros compostos minoritários (Gómez-Rico, Fregapane, & Salvador, 2008).

Na Galega Vulgar, o composto maioritário é o tirosol, que reflete ser este o possível composto responsável pela atividade antioxidante. No entanto, o efeito da maturação provoca uma diminuição de todos os seus compostos levando a que compostos como o ácido ferúlico e a oleuropeína se tornem quase inexistentes, em relação ao comportamento da oleuropeína esta é relacionado devido à degradação da mesma por via enzimática dando origem aos compostos oleuropeína aglicona e a ácidos elenoicos ligados a hidroxitirosol mostrando assim a razão do porquê do tirosol no estado de maturação aumentar ligeiramente, pois este pode advir de uma degradação do hidroxitirosol.(Esti, Cinquanta, & La Notte, 1998).

Na cultivar Picual foram detetados vários compostos, tais como o tirosol, compostos da família dos ácidos benzoicos, a rutina, o ácido siríngico, a luteolina-7-*O*-glucósido e compostos da família dos estilbenos. Dentro desta cultivar o comportamento dos compostos difere entre si sendo que o tirosol e os compostos da família dos estilbenos apresentam o mesmo comportamento diminuindo com o decorrer da maturação contudo este último nos estados semi verde e maduro apresenta picos mais elevados que o tirosol. Analisando os compostos, rutina e luteolina-7-*O*-glucósido vemos que existe um aumento do pico no estado maduro, sendo que na luteolina-7-*O*-glucósido este aumento é bastante elevado, comparando com a literatura este comportamento é observável nesta cultivar (Gómez-Rico et al., 2008). De uma maneira geral esta cultivar no seu estado maduro apresenta uma composição fenólica pouco degrada pois muitos dos compostos detetados aumentaram neste estado de maturação, este comportamento pode estar associado ao facto desta cultivar em casos de stress abiótico produzir mecanismos de tolerância ao stress, que influenciam na menor degradação dos compostos (Pedro & Ramalheiro, 2009).

3.3.2 Efeito do ataque do fungo *Colletotrichum acutatum*

Com o ataque do fungo *C. acutatum* as amostras infetadas apresentaram um decréscimo em relação as amostras não infetadas como se verificou no estudo realizado anteriormente, da mesma forma os compostos fenólicos apresentaram a mesma tendência, como mostra a tabela 4.

Tabela 4: Áreas dos picos dos composto identificados em três cultivares diferentes em três estados de maturação tendo sido infetadas.

Composto	TR (min)	Cobrançosa			Galega Vulgar			Picual		
		Verde	Semi Verde	Madura	Verde	Semi Verde	Madura	Verde	Semi Verde	Madura
Tirosol	14	913057	192700	420390	584396	655409	905735	360880	369291	388533
Ácido. Siringico	17	165626	47691	27080	62390	49955	23881	N.I	N.I	N.I
Ácido Benzóico N.I	17,9	N.I	N.I	N.I	124020	142193	117655	89520	132157	103594
	18,4	N.I	N.I	N.I	160426	245146	282034	130677	135232	152862
Rutina	24	260776	55787	8601	75916	62566	48555	26378	120054	73438
Ácido. Ferúlico	24,5	210011	3664	19884	2134	2249	2005	9007	2284	66923
Luteulina-7-O-glucósido	24,8	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	248	47163	162615
Estilbenos N.I	27,7	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	18806	26035	323067
Oleuropeína	28	149348	27385	55471	29424	34836	199	n.d	n.d	n.d
Secoiridóides N.I	29	239413	10542	7628	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I

TR- Tempo de retenção; N.I- Não identificado; os picos foram identificados a um comprimento de onda de 280nm

Analisando cultivar a cultivar vemos que na Cobrançosa compostos como ácido siríngico, rutina e alguns secoiridóides nos diferentes estados de maturação e com um ataque prolongado do fungo, somente são perceptíveis a sua presença nas azeitonas verdes, mostrando que no decorrer da maturação este compostos tornam-se residuais. O ácido ferúlico teve uma queda abrupta em relação as azeitonas não infetadas no estado semi verde tornando-se residual, o que mostra que este composto possivelmente não apresenta efeito sobre o fungo, contudo detetou-se um aumento residual na última fase da maturação. Por fim vemos que o tirosol seguiu o

mesmo comportamento que nas azeitonas não infetadas no entanto com a presença de picos mais baixos e oleuropeína foi degradada.

Na cultivar Galega Vulgar, podemos observar que logo a partir do estado de maturação verde esta apresenta uma perda acentuada de todo os seus compostos, sendo que o ácido siríngico, ácido ferúlico e oleuropeína tornam-se residuais. Já o tirosol apresenta maiores perdas no estado de maturação verde relativamente ao estado maduro quando atacado pelo fungo. Assim podemos afirmar que esta cultivar apresentou maior resistência no seu estado maduro.

Na cultivar Picual, os compostos ambos decrescem de uma maneira geral, nos estados verde e semi verde, vemos que após o ataque os compostos, como ácido siríngico, luteolina-7-O-glucósido e composto da família dos estilbenos, sofrem uma diminuição dos seus picos tornando-se quase inexistentes. No entanto no estado maduro os compostos fenólicos apresentam menor diminuição dos picos.

Capítulo 4

Conclusão

4. Conclusão

Com este trabalho conclui-se que o efeito da ação do fungo nas diferentes cultivares esta relacionado com a composição fenólica de cada cultivar, assim como o estado de maturação.

Deste modo verificou-se que a cultivar Galega Vulgar apresenta uma composição fenólica mais baixa em relação às outras cultivares, levando a que um ataque prolongado do fungo seja mais eficaz no seu efeito, pois esta irá oferecer menor resistência, devido a menor capacidade de defesa. Já cultivares com uma composição fenólica mais ampla e diversificada, pela presença de mais compostos com expressão na sua composição fenólica, como é o caso das cultivares Cobrançosa e Picual oferecem uma maior resistência ao ataque do fungo.

Do mesmo modo o efeito da maturação nas diferentes cultivares provoca variações na composição fenólica verificando que em certos estados de maturação, estas apresentam valores mais baixo. Concluiu-se ainda que em todas as cultivares o estado de maturação que ofereceu maior resistência ao efeito do fungo foi o estado verde.

Na quantificação da composição fenólica por HPLC das diferentes cultivares foram identificados vários compostos. Notou-se que os efeitos da maturação e do fungo provocaram alterações na sua presença e frequência nas diferentes cultivares.

Verificou-se que a cultivar Galega Vulgar apresentou no geral a menor área absoluta nos picos, durante a maturação e conseqüentemente após o ataque do fungo, contudo foi a que apresentou os picos mais elevados de tirosol.

Na cultivar Picual que se apresenta como resistente observou-se que na sua composição fenólica foram identificados compostos do grupo dos estilbenos e a luteolina-7-O- glucósido que não tiveram qualquer efeito nos estados iniciais da maturação no combate ao fungo contudo na ultima fase de maturação eles aumentaram podendo assim concluir que possivelmente a presença destes em conjunto com o tirosol possam ter um efeito inibidor.

Contudo é necessário um estudo aprofundado em cultivares resistentes para poder ser possível identificar quais os compostos que estão associados a resistência contra o fungo.

Capítulo 5

Bibliografía

5. Bibliografía

- Alves, A. C. G. (2013). Técnicas analíticas de controlo de qualidade de azeites, 151. Retrieved from <http://comum.rcaap.pt/handle/123456789/5835>
- Amiot, M. J., Fleuriet, A. y Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 823-826., 823–826.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006>
- Barranco, D., Fernandez-escobar, R., & Rallo, L. (2008). *EL CULTIVO DEL OLIVO* (6º). madrid: Ediciones Mundi-prensa Y Junta de Andalucía.
- Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D. A., Gil-Izquierdo, A., ... Domínguez-Perles, R. (2014). Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International*, 65(PC), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.021>
- Conde, P., Montelongo, M. J., & Leoni, C. (2014). Enfermedades del olivo organismos fitopatógenos, (August), 1–37.
- Dias, C., Domínguez-Perles, R., Aires, A., Teixeira, A., Rosa, E., Barros, A., & Saavedra, M. J. (2015). Phytochemistry and activity against digestive pathogens of grape (*Vitis vinifera* L.) stem's (poly)phenolic extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.033>
- Esti, M., Cinquanta, L., & La Notte, E. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32–35. <https://doi.org/10.1021/jf970391+>
- Gomes, S., Prieto, P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., & Guedes-Pinto, H. (2009). Development of *Colletotrichum acutatum* on tolerant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: A microscopic analysis. *Mycopathologia*, 168(4), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9211-y>
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor

- components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.02.003>
- Gouvinhas, I. (2016). *Impact of genetic background , maturation , and infection by Colletotrichum acutatum on the phytochemical composition of olives and olive oils : implementation of faster infrared screening tools.*
- Gouvinhas, I., De Almeida, J. M. M. M., Carvalho, T., Machado, N., & Barros, A. I. R. N. A. (2015). Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chemistry*, 174, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.037>
- Gouvinhas, I., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Barros, A., & Gomes, S. (2019). Impact of *Colletotrichum acutatum* Pathogen on Olive Phenylpropanoid Metabolism. *Agriculture*, 9(8), 173. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080173>
- Grave, A. (2013). Avaliação da variabilidade espacial da produtividade e qualidade da azeitona e azeite num olival semi-intensivo, 120.
- Guerrero, A. (2003). *Nueva Olivicultura* (5º edición). S.A. MUNDI-PRENSA LIBROS.
- Klen, T. J. (2014). Olive fruit phenols in olive oil processing: the fate and antioxidant potential, 227.
- Maria, C., & Meneses, G. (2012). Avaliação de resíduos em “azeitonas de mesa” resultantes dos tratamentos fitossanitários aplicados no combate à mosca-da-zeitona (*Bactrocera oleae* gmelin), ilha Terceira, Açores.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893–1906. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>
- Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2008). Influence of Fruit Maturity, Cultivar Susceptibility, and Inoculation Method on Infection of Olive Fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 92(10), 1421–1426. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1421>
- Moral, J., & Trapero, A. (2009). Resistencia del olivo a la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. *Boletín Informativo N° 66 Sociedad Española de Fitopatología*, (February), 22–30.
- Moral, Juan, Oliveira, R. De, & Trapero, A. (2008). Elucidation of the Disease Cycle of Olive Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum*.
- Morelló, J. R., Vuorela, S., Romero, M. P., Motilva, M. J., & Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity

- of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2002–2008. <https://doi.org/10.1021/jf048386a>
- Mougiou, N., Trika, F., Trantas, E., Ververidis, F., Makris, A., Argiriou, A., & Vlachonassios, K. E. (2018). Expression of hydroxytyrosol and oleuropein biosynthetic genes are correlated with metabolite accumulation during fruit development in olive, *Olea europaea*, cv. Koroneiki. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128(May), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.004>
- Nieto, L. M., Hodaifa, G., & Peña, J. L. L. (2010). Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2393–2398. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4097>
- Oteros, J., García-Mozo, H., Vázquez, L., Mestre, A., Domínguez-Vilches, E., & Galán, C. (2013). Modelling olive phenological response to weather and topography. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 179(November 2017), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.07.008>
- Ozdemir, Y., Tangu, N. A., Ozturk, A., Akcay, M. E., & Ercisli, S. (2018). Fruit characteristics of six candidate olive cultivars. *Folia Horticulturae*, 30(1), 169–177. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0017>
- Pedro, J., & Ramalheiro, C. (2009). Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades Agradecimentos.
- Pérez, A. G., León, L., Sanz, C., & de la Rosa, R. (2018). Fruit Phenolic Profiling: A New Selection Criterion in Olive Breeding Programs. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00241>
- Rallo, P., Jiménez, R., Morales-Sillero, A., Casanova, L., & Paz Suárez, M. (2012). Evaluation of Table-Olive Quality Parameters in Progenies Obtained By Cross-Breeding. *Acta Horticulturae*, (949), 527–531. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.949.77>
- Rodrigo Ricardo Ramos. (2014). Desenvolvimento de uma Metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para Análise SARA de Petróleo, 84.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., & Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 964–967. <https://doi.org/10.1021/jf980264t>
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., & Montedoro, G. F. (1999). Phenolic compounds of olive fruit: One- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 12–18. <https://doi.org/10.1021/jf9806210>

- Silva Monteiro, F. (n.d.). Olive oil ' s polyphenolic metabolites : from their influence on human health to their chemical synthesis, 44.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Determination of phenolic compounds of “Sikitita” olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents “Arbequina” and “Picual” olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.014>
- Talhinhas, P., Ferreira, P., & Oliveira, H. (2003). *Comunicações Orais – Olival Espécies de Colletotrichum responsáveis pela gafa da oliveira Comunicações Orais – Olival*.
- Talhinhas, Pedro, Loureiro, A., & Oliveira, H. (2018). Olive anthracnose: a yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1797–1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
- Uceda, M., & Hermoso, M. (1998). La calidad del aceite de oliva. In D. Barranco, R. Fernandez-escobar, & L. Rallo (Eds.), *El Cultivo del Olivo* (Junta de A, pp. 547–572). Madrid, Spain.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., ... Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89(4), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.012>
- Wharton, Phillip S, J. D.-U. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum* by. *Anales Del Jardin Botánico de Madrid*, 61(1), 3–22. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)