



'Cobrançosa' olive oil and drupe: chemical composition in two ripening stages



Cláudia Manuela Correia de Sousa

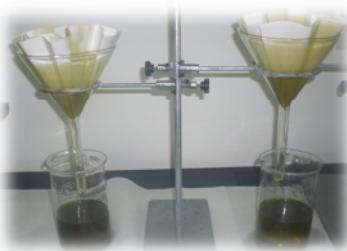


2º Ciclo em Biotecnologia e Qualidade Alimentar



Orientador: Professora Doutora Ana Novo Barros

Co-orientador: Professora Doutora Paula Martins-Lopes



VILA REAL, 2012

Agradecimentos

Com a realização desta dissertação de mestrado termina mais uma etapa e cumpre-se mais um objetivo de vida. Desta forma é essencial agradecer a todas as pessoas que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a sua elaboração. Por isso, um grande obrigado de coração a todos, mas em particular:

À orientadora, Professora Doutora Ana Barros, pelo seu imenso profissionalismo, mas essencialmente por ser uma pessoa muito humana. Obrigado pela inteira dedicação, apoio, pela paciência demonstrada com todas as minhas distrações, pela compreensão, pela palavra sempre meiga, pela tranquilidade e por todos os sábios conselhos que sempre me transmitiu quando eu stressava mais do que era preciso. Obrigada pela confiança sempre demonstrada, pelas tardes no seu gabinete que fizeram toda a diferença e acima de tudo por se ter tornado uma amiga de coração. É uma mulher muito bonita, muito especial, batalhadora, querida e acima de tudo uma “Fixolas”.

À Professora Doutora Paula Martins-Lopes, co-orientadora, que é uma excelente profissional. Obrigada por toda a disponibilidade e empenho demonstrado, pelas deslocações a Mirandela, por todas as boas sugestões, assim como pela preocupação e confiança demonstrada ao longo de todo o trabalho. Gostei muito de a conhecer melhor, como professora e como pessoa, foi compensador trabalhar e aprender consigo. É uma “fixolas”.

À Professora Doutora Alice, que demonstrou total disponibilidade na parte sensorial, sempre muito simpática. Obrigada pelo apoio.

Ao Professor Doutor Fernando Nunes, sempre disponível na parte do HPLC.

Ao Engenheiro João Lopes de Mirandela (DRAPN), que nos auxiliou na colheita das amostras e nos cedeu o material para o trabalho.

À Professora Doutora Maria Teresa Carvalho e aos funcionários da Unidade Nacional de Investigação Agrária, onde foram realizadas as extrações do azeite. Obrigada pela disponibilidade e pelo espaço cedido.

A todo o pessoal do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em especial à Ana Abraão, ao André Lemos, ao Sr. Carlos e à D. Paula que sempre cederam material quando necessário e se mostraram sempre disponíveis.

A todos os meus amigos que fazem parte das minhas histórias e que desde sempre me acompanharam em todo o meu percurso e me fazem todos os dias acreditar que eu sou capaz. Obrigada por todos os momentos.

À Diana Barreira, Irene Gouvinhas e Eunice Moreira (que deviam me agradecer por as aturar todos os dias, não é?), companheiras dos meus dias no laboratório e que sempre estiveram lá para me ajudar. Tornamos os laboratórios muito mais animados com todas as músicas, gargalhadas, cantorias e histórias. Foi bom trabalhar assim.

Um obrigado especial à minha mana do coração, Diana Barreira que até me arranjou uma família transmontana. Há amigos que não são de sempre, mas vão ser para sempre. Sê Feliz.

Finalmente resta-me agradecer à minha manusca e ao meu papusco que são o meu orgulho, sem eles este sonho não teria sido possível, sem eles, não era parte da pessoa que sou hoje. Obrigada por me guiarem sempre e por me ajudarem a lutar sempre pelo meu futuro.

Índice Temático

<i>Agradecimentos</i>	ii
<i>Índice de Gráficos</i>	v
Capítulo I – Enquadramento Temático	2
1.1. A oliveira – <i>Olea Europaea</i> L.	2
1.2. Produção de azeite em Portugal e no Mundo	2
1.3. A cultivar Cobrançosa – Características	4
1.4. A dieta Mediterrânea e a importância do consumo de azeitona e azeite na saúde	5
1.5. Composição química da azeitona	5
1.6. Composição química do azeite	6
1.7. Estado de maturação da azeitona e as características do azeite	7
1.8. Os compostos fenólicos e as características sensoriais do azeite	7
1.9. Objetivos do trabalho	9
1.10. Comparação dos parâmetros: atividade antioxidante, compostos fenólicos, <i>ortho</i> -difenois e flavonoides entre o estado semi-verde e maduro de Clones de azeitona da cultivar Cobrançosa.	11
1.11. Comparação dos parâmetros: atividade antioxidante, compostos fenólicos, <i>ortho</i> -difenois e flavonoides entre o estado semi-verde e maduro de azeites da cultivar Cobrançosa	15
1.12. Perfil fenólico dos Clones de azeitonas	19
1.13. Perfil fenólico dos azeites	20
1.14. Análise sensorial dos azeites	21
1.15. Referências bibliográficas.....	23
Capítulo II - 'Cobrançosa' olive oil and drupe: chemical composition in two ripening stages	24
'Cobrançosa' olive oil and drupe: chemical composition in two ripening stages ..	25
Capítulo III – Conclusões e perspetivas para trabalho futuro	56
3.1. Conclusões	57
3.2. Perspetivas para trabalho futuro	58

Índice de gráficos

Gráfico a) Comparação da atividade antioxidante dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico b) Comparação do teor em fenóis totais dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico c) Comparação do teor em *ortho*-difenóis dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

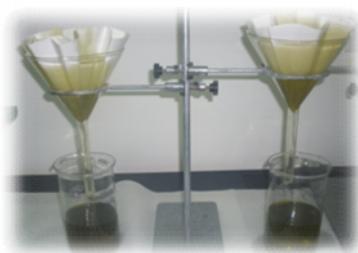
Gráfico d) Comparação do teor em flavonoides dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico e) Comparação da atividade antioxidante dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico f) Comparação do teor em fenóis totais dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico g) Comparação do teor em *ortho*-difenóis dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Gráfico h) Comparação do teor em flavonoides dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.



Capítulo I – Enquadramento Temático

1.1. A oliveira - *Olea europaea* L.

A oliveira (*Olea europaea* L.) é a única espécie da família Oleaceae com fruto comestível e é das plantas cultivadas mais antigas, cuja origem data de 4000-3000 anos a.C. na zona da Palestina (Bacelar et al., 2009). É descrita como sendo uma cultura amplamente dispersa por todo o mundo, facto que está relacionado com a sua adaptabilidade a diversas condições ambientais e que resultam de algumas características específicas, tais como: elevada tolerância à seca e à salinidade e os requisitos mínimos de manutenção do olival. Além disso, é reconhecida pelo elevado valor nutricional dos seus produtos, a azeitona e o azeite (Seabra et al., 2010).

A cultura da oliveira e a valorização dos seus produtos tornou-se uma atividade económica promissora ao longo dos tempos.

1.2. Produção de azeite em Portugal e no Mundo

Cerca de 95% da superfície oleícola está localizada na zona Mediterrâника, sendo que, os principais países produtores da União Europeia como a Espanha, Itália, Grécia e Portugal são responsáveis por 71% da produção de azeite a nível mundial, (Azeite, 2012). Existem no entanto países como a Síria (6,6%), Turquia (5,4%), Marrocos (5,1%) Tunísia (4,1%) e a Argélia (1,6%) que também pertencem ao grupo dos principais países produtores (Azeite, 2012).

Em Portugal, o olival é uma cultura tradicional e tem uma importância económica em várias regiões do continente.

Apesar de, a sua cultura estar presente em todas as regiões agrárias, as principais regiões produtoras são a região do Alentejo e a de Trás-os-Montes (MADRP, 2007). A vocação predominante do olival português é para a produção de azeite, sendo que cerca de 96% da azeitona produzida é destinada para a elaboração deste produto e os restantes 4% destinam-se à produção de azeitona de mesa (MADRP, 2007).

Nos últimos anos tem-se assistido a uma evolução e até mesmo a uma recuperação na produção de azeite, após um decréscimo acentuado entre as décadas de 60 a 80, sendo que, a estimativa para a produção nacional na campanha 2010/2011 aponta para um valor de 70 mil toneladas de azeite produzido (Azeite, 2012).

Na região de Trás-os-Montes a produção de azeite e azeitona de mesa é uma fonte de rendimento para uma população que se ocupa principalmente e, por vezes, exclusivamente dessa cultura; as características desta região como: as condições edafoclimáticas, a qualidade dos solos, as variedades dominantes e características (Verdeal Transmontana, Cobrançosa, Madural e Cordovil), assim como as técnicas tradicionais de produção potenciam os requisitos necessários para um azeite de alta qualidade que é bastante apreciado (MADRP, 2007; Amaral et al., 2010; Vaz, 2011).

1.3. A cultivar Cobrançosa – Características

A ‘Cobrançosa’ é uma cultivar portuguesa bastante produtiva que está autorizada em todas as regiões agrárias (Algarve, Alentejo, Ribatejo, Beiras e Trás-os-Montes). No entanto, tem maior incidência na região de Trás-os-Montes e Alto Douro e é essencialmente utilizada para a produção de azeite com Denominação de Origem Protegida (DOP) (Alves, 2007).

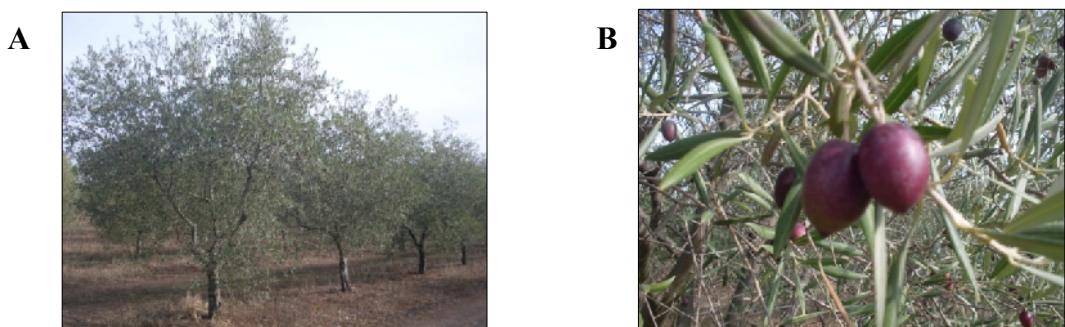


Figura 1. Cultivar Cobrançosa A) aspetto geral da árvore; B) aspetto do fruto.

Fotografia capturada no campo Clonal em Mirandela.

As oliveiras desta cultivar são árvores de porte pequeno ou médio (Figura 1A) cujo fruto é elipsoidal e de tamanho médio com forma apical pontiaguda ou arredondada (Figura 1B). Apresenta um bom rendimento em azeite (Vaz, 2011).

Mirandela é o conselho com maior número de oliveiras na região do Nordeste Transmontano, com aproximadamente 950 000 oliveiras, sendo que a cultivar Cobrançosa detém 30% da cota do olival que caracteriza esta zona (Vaz, 2011).

1.4. A dieta Mediterrânea e a importância do consumo de azeitona e azeite na saúde

As azeitonas e o azeite são uma componente muito importante e característica da dieta mediterrânea e são produtos muito conhecidos por serem uma fonte natural de compostos fenólicos, que são importantes antioxidantes naturais.

Um grande número de estudos epidemiológicos e experimentais relaciona o consumo destes produtos com a prevenção de certas doenças (Cioffi et al., 2009). Desempenham assim um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, algumas doenças do foro cancerígena, diabetes, casos de hipertensão, obesidade e em doenças cognitivas como o caso do Alzheimer (Cioffi et al., 2009).

A oleuropeína, secoiridoide presente na azeitona e no azeite sob a forma de aglicona, apresenta uma ação anti-hipertensiva (Visioli et al., 2002).

1.5. Composição química da azeitona

A azeitona é uma drupa, ou seja, um fruto carnoso com apenas uma semente. É constituída maioritariamente por água (70 a 75%), por um baixo teor de açúcar (2,6 a 6%) e proteína (3%) e por um elevado teor de óleo (12 a 30%) que depende do estado de maturação do fruto (Conde et al., 2008; COI, 2012).

A concentração de compostos fenólicos na azeitona varia entre 1 e 3% de acordo com Servili e Montedoro (2002), sendo que as principais classes de compostos fenólicos existentes na azeitona incluem: ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides e os secoiridoides.

Os principais álcoois fenólicos são o hidroxitirosol e o tirosol, a luteolina-7-*O*-glucósido, rutina e a apigenina-7-*O*-glucósido são os flavonoides mais frequentemente descritos na literatura.

Os secoiridoides predominantes na azeitona são a oleuropeína e o ligostrósido, enquanto o verbascósido é o principal ácido hidroxicinâmico (Vinhos et al., 2005; Silva et al., 2006).

1.6. Composição química do azeite

O azeite é um produto obtido exclusivamente a partir do fruto da oliveira COI, (2012), é uma gordura líquida à temperatura de 20°C obtida mediante processos de extração física, depuração e refinação, podendo desta forma ser classificado em azeite virgem ou em azeite refinado (Regulamento CEE N° 2568/91).

De acordo com Tuck et al. (2002) existem cerca de 30 compostos fenólicos, sendo que as principais classes identificadas e quantificadas são os fenóis simples, como o hidroxitirosol e tirosol, os secoiridoides como a oleuropeína, a aglicona do ligostrósido e a seu respetivo dialdeído descarboxilado e as linhanas como o (+)-acetopinoresinol e o (+) - pinoresinol. As três classes mencionadas e de acordo com Owen et al. (2000) têm um forte potencial antioxidante, sendo que a concentração de compostos fenólicos nos azeites varia entre 100 e 800 mg/kg (Tuck et al., 2002).

1.7. Estado de maturação da azeitona e as características do azeite

O estado de maturação da azeitona no momento da colheita, o método utilizado na apanha e o acondicionamento dos frutos antes da laboração, são factores que influenciam significativamente a qualidade do azeite (Lopes et al., 2009).

A maturação da azeitona inicia-se quando é possível observar nos frutos os primeiros tons violáceos e termina quando estes atingem a coloração característica da pele e da polpa correspondente a cada variedade (Lopes et al., 2009).

Apesar de o conteúdo total de gordura aumentar com a maturação e atingir o valor máximo quando os frutos se encontram bem maduros, a qualidade do azeite de acordo com os melhores padrões obtém-se antes da maturação completa dos frutos, ou seja, quando a azeitona ainda não está completamente madura (Pires, 2005; Lopes et al., 2009).

Como forma de valorizar a produção e atendendo à tendência global dos mercados, a colheita da azeitona tende a ser antecipada, o azeite torna-se mais frutado, com sabor a azeitona fresca, sem defeitos que o penalizem e dependendo de cada cultivar, com um amargo e picante característico (Lopes et al., 2009).

1.8. Os compostos fenólicos e as características sensoriais do azeite

As substâncias fenólicas naturais estão presentes no azeite em quantidades apreciáveis. Para além de conferirem maior resistência à oxidação, são ainda responsáveis pelas características sensoriais (Hajimahmoodi et al., 2008).

O azeite pode apresentar vários aromas, sabores e até diferentes tonalidades. Estas características estão dependentes de fatores como a cultivar em estudo, situação geográfica do olival, estado sanitário dos frutos, processo de extração e das condições de armazenamento e conservação (Vaz, 2011).

As mudanças na composição fenólica influenciam as características sensoriais do azeite. Um atraso na época da colheita da azeitona origina um azeite menos fragante, mais apagado, menos amargo e mais suave, desde que o fruto seja são e proveniente da árvore (Vaz, 2011).

De acordo com Visioli et al. (2002), os ácidos fenólicos são responsáveis pelo amargo encontrado nos azeites, e a classe dos secoiridoides confere um picante característico. Os azeites definidos como “doces” são menos ricos em compostos fenólicos.

1.9. Objetivos do trabalho

Na região de Trás-os-Montes, alguns olivicultores iniciam a colheita da azeitona durante os primeiros dias do mês de Novembro. No entanto a tendência atual em diversas cultivares e inclusive na cultivar Cobrançosa é antecipar a data de colheita.

Sabe-se porém que o estado de maturação do fruto influencia significativamente a composição fenólica e a qualidade do azeite. Desta forma, o principal objetivo deste estudo é comparar o perfil fenólico de seis Clones de azeitonas da cultivar Cobrançosa e dos seus respetivos azeites em dois estados de maturação diferentes: estado semi-verde e estado maduro, com o intuito de avaliar se existem diferenças significativas entre os dois estados de maturação estudados. Assim no início de Outubro (14/10/2011) foram colhidos os seis Clones de azeitonas no estado Semi-verde e no início de Novembro (08/11/2011) as mesmas amostras foram colhidas no estado Maduro.

As amostras de azeite foram também submetidas a uma análise sensorial, com o objetivo de avaliar se os dois estados de maturação provocam alterações sensorialmente significativas.

Para os Clones de azeitonas e os seus respetivos azeites nos dois estados de maturação foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Atividade antioxidante - Método do ABTS^{*};
- Fenóis totais - Método Colorimétrico de Folin-Ciocalteau
- *Orto*-difenóis - Determinação colorimétrica por complexação dos *orto*-difenóis com os iões molibdato;
- Flavonoides - Método com Cloreto de Alumínio;
- Correlação entre a atividade antioxidante e o teor em fenóis totais;
- Correlação entre a atividade antioxidante e o teor em *orto*-difenóis;

- Correlação entre a atividade antioxidante e o teor em flavonoides;
- Determinação do perfil fenólico das amostras por RP-HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Fase Reversa);
- Análise sensorial dos azeites obtidos nos dois estados de maturação

Os seis Clones de azeitonas estudados foram escolhidos tendo em conta um estudo realizado durante 2 anos consecutivos na qual se utilizaram 24 Clones provenientes de um Campo Clonal situado em Mirandela.

Os olivicultores catalogaram todos os Clones de acordo com o rendimento de produção e foram estudados os parâmetros químicos em cima mencionados. Verificou-se uma correlação entre o rendimento de produção e a atividade antioxidante, ou seja Clones com alto rendimento de produção apresentavam elevada atividade antioxidante e os Clones catalogados com baixo rendimento de produção apresentavam baixa atividade antioxidante. No entanto surgiram três exceções.

A amostragem escolhida para a realização deste trabalho engloba as três exceções estudadas anteriormente: Clone 14 e 49 (baixo rendimento de produção e alta atividade antioxidante) e o Clone 111 (alto rendimento de produção e baixa atividade antioxidante). Foram também escolhidos os Clones 80 e 85 que apresentaram o maior valor de atividade antioxidante e eram de alto rendimento de produção e o Clone 110 onde se verificou o menor valor de atividade antioxidante e foi catalogado com baixo rendimento de produção.

1.10. Comparação dos parâmetros: atividade antioxidante, compostos fenólicos, orto-difenois e flavonoides entre o estado semi-verde e maduro de Clones de azeitona da cultivar Cobrançosa.

Neste trabalho foram avaliadas as modificações fenólicas e atividade antioxidante de seis Clones de azeitonas da cultivar 'Cobrançosa' entre dois estados de maturação. Os resultados encontram-se representados na tabela 1.

Os resultados da atividade antioxidante variaram entre $56,59 \pm 4,39$ (Clone 110) e $138,87 \pm 6,81$ mmol trolox kg⁻¹ (Clone 80) para o estado semi-verde e entre $72,14 \pm 6,33$ (Clone 110) a $139,32 \pm 21,33$ mmol trolox kg⁻¹ (Clone 85) no estado maduro (Tabela 1, Gráfico a). Ao comparar a atividade antioxidante de todos os Clones entre os dois estados de maturação verificou-se que apenas no Clone 85 existem diferenças significativas entre o estado semi-verde e o estado maduro ($p < 0,05$).

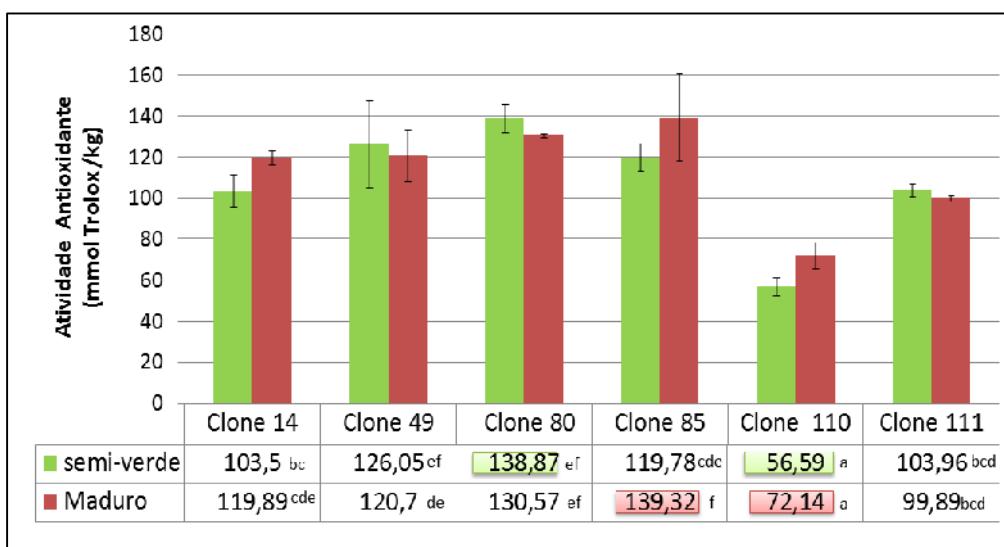


Gráfico a) Comparação da atividade antioxidante dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Nos Clones 14, 49, 80, 110 e 111 em relação a este parâmetro não existem diferenças significativas entre os dois estados. Verificou-se ainda que os Clones tendem a comportar-se da mesma maneira em relação a estudos anteriores sendo que, o Clone 110 é o que apresenta menor atividade antioxidante e os Clones 80 e 85 apresentam os maiores valores de atividade antioxidante, independentemente do estado de maturação.

Em relação ao teor em fenóis totais, os resultados variaram respetivamente entre $16,95 \pm 0,82$ (Clone 110) e $29,72 \pm 0,95$ mg ácido gálico g^{-1} (Clone 80) e entre $21,78 \pm 0,90$ (Clone 110) a $33,96 \pm 1,79$ mg ácido gálico g^{-1} (Clone 14) para o estado semi-verde e maduro, respetivamente (Tabela 1 e Gráfico b).

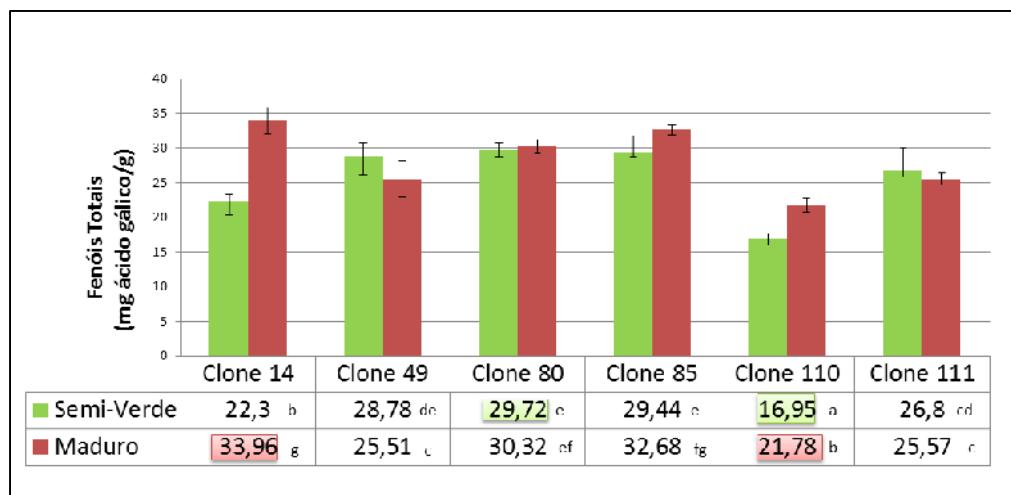


Gráfico b) Comparaçāo do teor em fenóis totais dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

O conteúdo em fenóis totais, segundo os resultados de Tovar et al. (2002) para a cultivar Arbequina (g ácido cafeico kg^{-1} peso seco) diminui significativamente do estado verde para o estado maduro.

Contudo ao comparar dois estados de maturação próximos (semi-verde e maduro) verificou-se que não existiam diferenças significativas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para os Clones 80 e 111. Nos Clones 14, 85 e 110 o conteúdo em fenóis totais aumentou significativamente com a maturação e no Clone 49 diminuiu significativamente.

Nos *ortho*-difenois os resultados variaram para o estado semi-verde entre $13,61 \pm 1,24$ (Clone 110) e $41,65 \pm 3,68$ mg ácido gálico g^{-1} (Clone 49) e entre $15,84 \pm 0,76$ (Clone 110) e $40,76 \pm 6,81$ mg ácido gálico g^{-1} (Clone 80) para o estado maduro (Tabela 1; Gráfico c). Para os Clones 14 e 80 o conteúdo em *ortho*-difenois aumentou significativamente com o estado de maturação. Em relação aos Clones 49 e 111 o mesmo conteúdo diminuiu significativamente. Nos Clones 85 e 110 não se verificaram diferenças significativas entre os dois estados de maturação ($p > 0,05$).

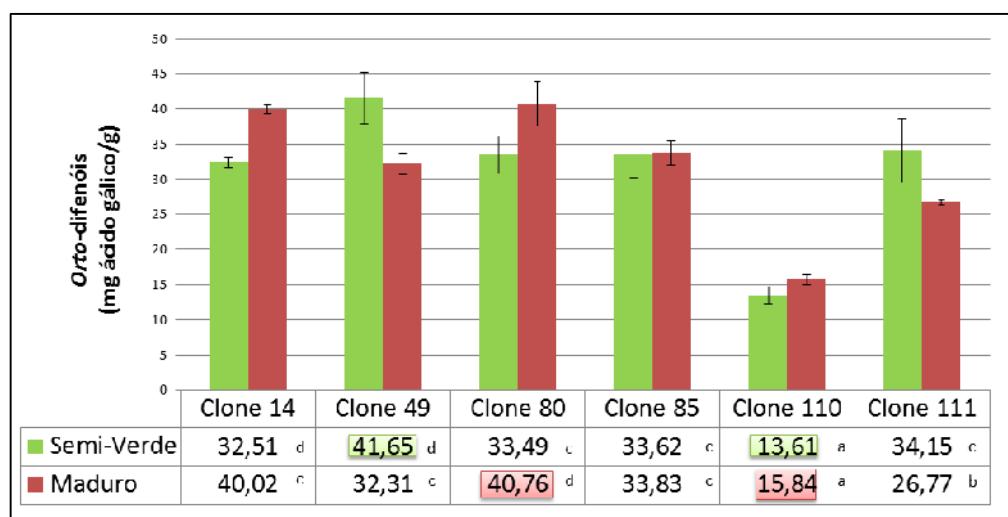


Gráfico c) Comparaçāo do teor em *ortho*-difenois dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Em relação ao conteúdo em flavonoides, para o estado semi-verde os resultados variaram entre $5,08 \pm 0,46$ (Clone 110) e $21,56 \pm 1,58$ mg catequina g⁻¹ (Clone 49) e para o estado maduro $7,24 \pm 0,78$ (Clone 110) e $26,15 \pm 1,47$ mg catequina g⁻¹ (Clone 14) (Tabela 1; Gráfico d).

O comportamento do conteúdo em flavonoides é semelhante ao dos fenóis totais com exceção do clone 111, no qual se verificou uma diminuição significativa entre o estado semi-verde e maduro.

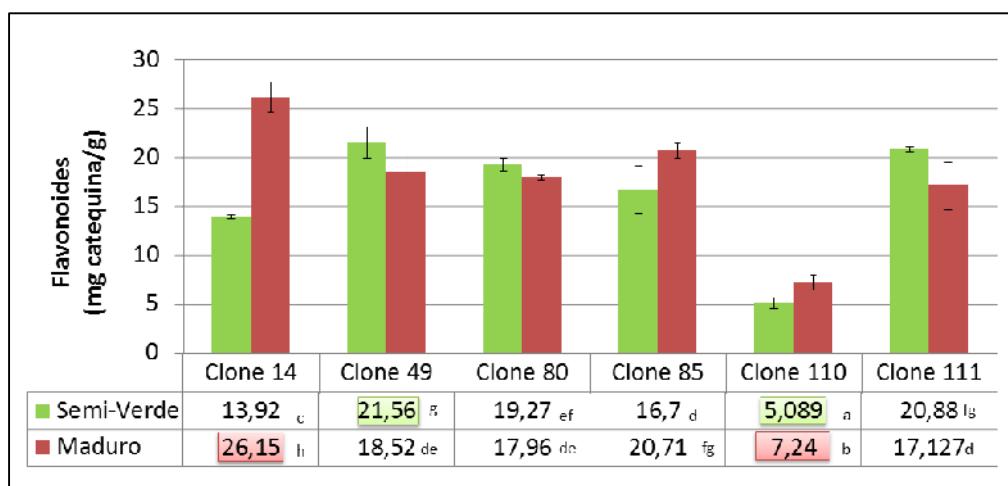


Gráfico d) Comparação do teor em flavonoides dos 6 Clones de azeitona 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Todos os parâmetros têm uma correlação significativa com a atividade antioxidante, sendo que, os compostos fenólicos são responsáveis por 87,56% da atividade antioxidante e os *ortho*-difenóis e flavonoides por 86,83% e 82,34% da atividade antioxidante, respetivamente (Figura 1).

1.11. Comparação dos parâmetros: atividade antioxidante, compostos fenólicos, *orto*-difenois e flavonoides entre o estado semi-verde e maduro de azeites da cultivar Cobrançosa.

Os resultados para a atividade antioxidante, fenóis totais, *orto*-difenois e flavonoides encontram-se representados na tabela 2.

Os valores da atividade antioxidante para os azeites estudados da cultivar Cobrançosa variaram entre: $3,01 \pm 0,12$ (Clone 110) e $7,49 \pm 0,26$ mmoles trolox kg⁻¹ (Clone 49) para o estado semi-verde e $2,46 \pm 0,15$ (Clone 110) a $6,54 \pm 0,56$ mmoles trolox kg⁻¹ (Clones 80) para o estado maduro (Tabela 2; Gráfico e).

Ao comparar os dois estados de maturação verificou-se que três Clones 80, 110 e 111 mantiveram o mesmo comportamento que as azeitonas em relação à atividade antioxidante e não se verificaram diferenças significativas entre o estado semi-verde e maduro. Nestes três casos parece não haver efeito negativo na colheita antecipada das azeitonas, evitando assim, quer a perda de frutos quer a infecção por fungos causados por uma colheita tardia (Gomes et al., 2012).

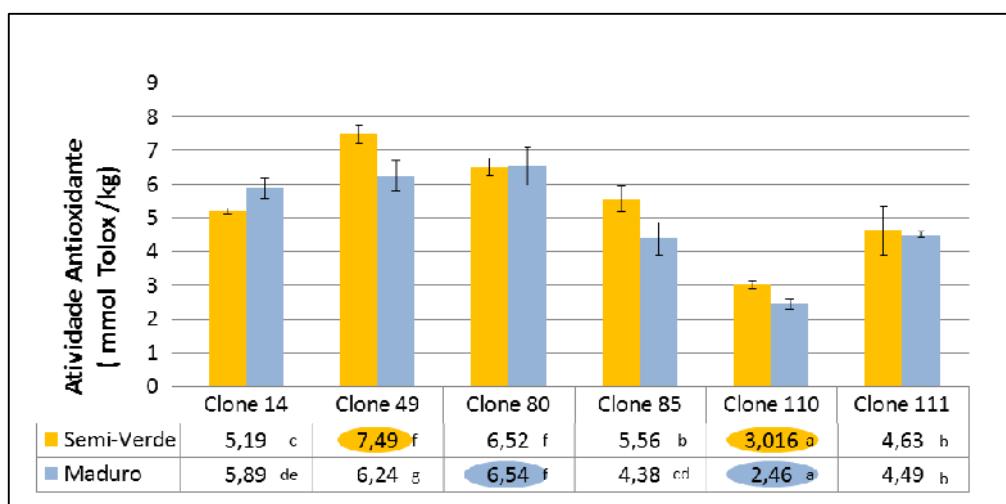


Gráfico e) Comparação da atividade antioxidante dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Todas as amostras apresentaram valores de atividade antioxidante mais elevados quando comparadas com os resultados obtidos para duas cultivares Tunisinas em que os resultados variaram entre $0,61 \pm 0,09$ e $2,42 \pm 0,12$ mmol trolox kg $^{-1}$ (Nabki et al., 2010). Este facto torna a cultivar Cobrançosa bastante interessante para a produção de azeite pelos seus elevados valores de atividade antioxidante, estabilidade, *flavor* e cor.

O conteúdo em fenóis totais dos azeites analisados, independentemente do estado de maturação, variou entre: $0,39 \pm 0,01$ e $1,72 \pm 0,02$ mg ácido gálico g $^{-1}$. Estes resultados mais uma vez são elevados quando comparados com os obtidos por Nabki et al. (2010) com duas cultivares Tunisinas: Chétoui ($0,395$ mg ácido gálico g $^{-1}$) e Chemlati ($0,158$ mg ácido gálico g $^{-1}$).

Para o estado semi-verde os valores variaram entre $0,74 \pm 0,01$ (Clone 110) a $1,72 \pm 0,02$ (Clone 49) e para o estado maduro entre $0,39 \pm 0,01$ (Clone 110) to $1,46 \pm 0,10$ mg ácido gálico g $^{-1}$ (Clone 80) (Tabela 2; Gráfico f).

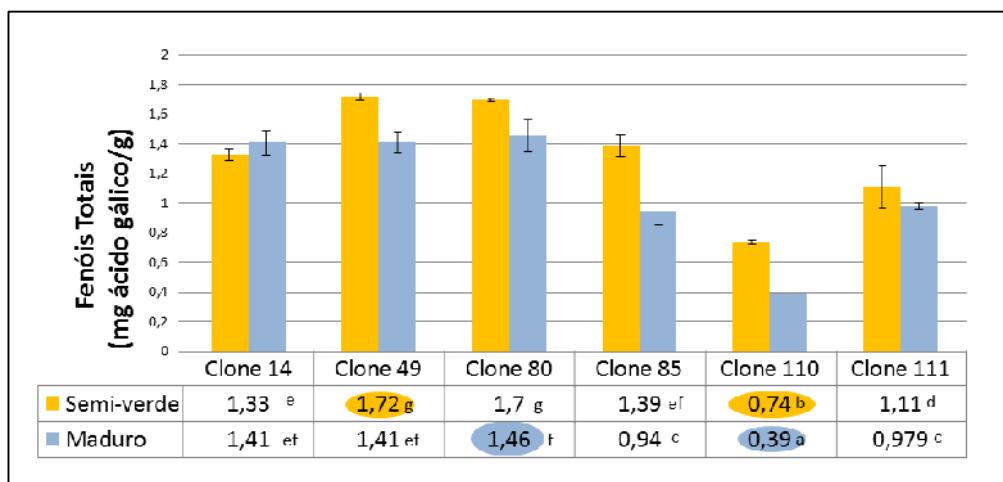


Gráfico f) Comparaçao do teor em fenóis totais dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Para todos os Clones, o conteúdo em fenóis totais diminuiu significativamente com o estado de maturação, com exceção do Clone 14, onde não se verificaram diferenças significativas entre os dois estados ($p > 0,05$).

Em relação ao conteúdo em *orto*-difenois, nos Clones 49, 80, 110 e 111 não se verificaram diferenças significativas entre os dois estados de maturação, enquanto que nos Clones 14 e 85 se observaram diferenças significativas. Contudo, no Clone 14 houve um aumento significativo do conteúdo em *orto*-difenois e no Clone 85 uma diminuição do mesmo conteúdo (Tabela 2; Gráfico g). Mais uma vez, verificou-se que o conteúdo em *orto*-difenois dos azeites estudados da cultivar Cobrançosa foram elevados quando comparados com resultados da bibliografia, $0,1334 \text{ mg ácido gálico g}^{-1}$; $0,05319 \text{ mg ácido gálico g}^{-1}$ (Nabki et al., 2010).

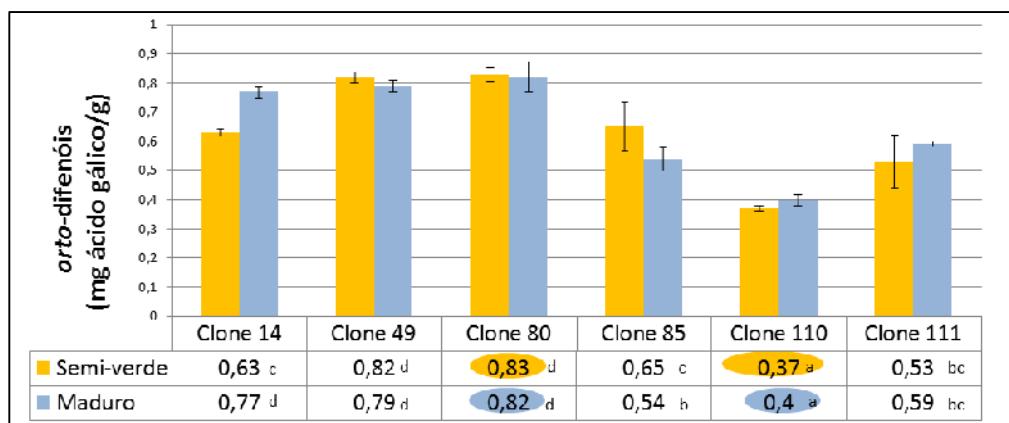


Gráfico g) Comparaçāo do teor em *orto*-difenois dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Os flavonoides variaram entre $0,78 \pm 0,01$ (Clone 110) e $1,96 \pm 0,03$ mg catequina g⁻¹ (Clone 49) no estado semi-verde e entre $0,65 \pm 0,03$ (Clone 110) e $1,7 \pm 0,13$ (Clone 80) para o estado maduro (Tabela 2; Gráfico h). Ao comparar o conteúdo em flavonoides entre o estado semi-verde e maduro, para todos os Clones, com exceção do 49, não existiram diferenças significativas.

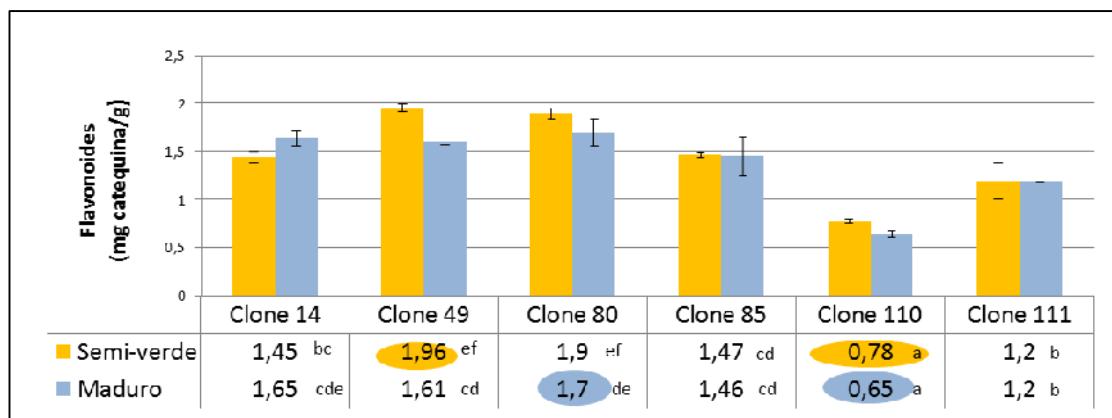


Gráfico h) Comparaçāo do teor em flavonoides dos 6 azeites 'Cobrançosa' entre o estado semi-verde e maduro.

Os fenóis totais são responsáveis por 96,54% da atividade antioxidante enquanto os *ortho*-difenóis e os flavonoides são responsáveis por 97,18 e 96,24%, respectivamente. Verificou-se assim uma correlaçāo altamente significativa de todos os parâmetros com a atividade antioxidante (Figura 2).

1.12. Perfil fenólico dos Clones de azeitonas

O perfil fenólico dos Clones de azeitonas da cultivar Cobrançosa foram analisados por RP-HPLC-DAD.

Os principais compostos identificados compreendem a classe dos ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonoides e secoiridoides. Os diferentes Clones estudados apresentam um perfil fenólico semelhante, no entanto os compostos fenólicos identificados apresentam diferentes percentagens de área.

O hidroxitirosol é o álcool fenólico presente nas azeitonas que mais frequentemente é descrito na literatura. Está presente em todos os Clones e de um modo geral os seus valores de percentagem de área entre o estado semi-verde e maduro, não apresentam diferenças relevantes. No entanto, o Clone 110 é uma exceção, uma vez que apresenta valores mais elevados quando comparado com os restantes clones, tanto no estado semi-verde como no estado maduro, destacando-se o estado semi-verde com maior percentagem de área (Tabela 3).

De acordo com Vinhas et al. (2005) o verbascósido é o principal ácido hidroxicinâmico presente nos produtos da oliveira. Nas amostras estudadas, este composto surge com diferentes percentagens de área entre os clones, apresentando valores de 1,92% para o estado semi-verde no Clone 110 e para o mesmo estado de maturação valores de 35,75% no Clone 14. Globalmente, os valores de percentagem de área para este composto diminuem com o estado de maturação, com exceção do clone 85, no qual se verificou um aumento da percentagem de área do verbascósido.

Alguns compostos detetados nas amostras estudadas, não foram identificados, uma vez que não dispúnhamos nem de dados da literatura nem de padrões que permitissem a sua identificação inequívoca. Um desses compostos surge com um tempo de retenção de 28,00 min e é apenas detetado no estado maduro e no Clone 14. Contudo apresenta uma percentagem de área considerável (10,94%) e é um dos maiores compostos identificados (Tabela 3).

A rutina foi identificada em todos os Clones, mas apenas no estado maduro. No entanto, de acordo com os resultados de Morelló et al. (2005), este flavonóide está presente em todos os estados de maturação.

A oleuropeína e o ligostrósido são os secoiridoides mais importantes na azeitona (Morelló et al., 2005). Em relação ao ligostrósido, este foi identificado em todos os clones com uma baixa percentagem de área; no entanto, o Clone 110 foi uma exceção, apresentando uma das percentagens de área maiores. A oleuropeína não foi identificada neste Clone, estando no entanto presente em todos os outros Clones no estado semi-verde.

Um outro composto desconhecido foi identificado com um tempo de retenção de 68,65 min com uma elevada percentagem de área, principalmente no Clone 110.

1.13. Perfil fenólico dos azeites

Os diferentes Clones têm um perfil fenólico semelhante entre os dois estados de maturação, uma vez que, os compostos identificados são semelhantes assim como as percentagens de área (Figura 3), com exceção do Clone 110. Neste Clone, o flavonoide luteolina-7-O-glucósido apresenta uma percentagem de área elevada em ambos os estados de maturação, quando comparada com os restantes Clones.

No entanto, os compostos identificados com tempos de retenção de 41,43 e 45,70 min neste Clone apresentam valores de percentagem de área mais baixos, em ambos os estados de maturação (Tabela 4).

Os compostos com maior percentagem de área foram identificados com tempos de retenção elevados. Mais uma vez, este facto não permite a sua identificação, uma vez que não são comparáveis nem com padrões nem com literatura.

1.14. Análise sensorial dos azeites

Os resultados da avaliação organolética mostraram que as diferentes amostras de azeite da cultivar Cobrançosa – Mirandela em dois estados de maturação foram significativamente diferentes apenas em três atributos: aroma a erva, *flavor* a erva e no sabor amargo.

Verificou-se que as características consideradas como defeitos dos azeites (Regulamento CEE Nº 2568/91) como aroma a ranço, aroma a vinagre, *flavor* metálico, *flavor* a terra, sensação de vinagre e sensação metálica estão presentes a um nível mínimo.

A análise de Clusters descreve a formação de dois grandes grupos, divididos de acordo com o estado de maturação. O grupo 1 engloba os clones numerados do numero (1 a 6), Clone 14 ao 111 no estado semi-verde, enquanto que o grupo 2 engloba os Clones numerados de (7 a 12), no Clone 14 a 111 no estado maduro (Figura 4).

A análise de componentes principais sugere duas componentes principais, que juntas explicam 88% da variação total dos atributos sensoriais.

Os atributos que mais contribuíram para a componente principal 1 foram: aroma a erva, *flavor* a erva e a sensação metálica (Figura 5). Para a componente principal 2, os atributos que mais contribuíram foram o sabor amargo e a sensação picante.

De entre todas as amostras avaliadas, os provadores mostraram preferência pelo Clone 110 no estado maduro. Esta amostra apresenta um valor médio para o sabor amargo, um aroma a erva elevado e um valor médio para o *flavor* a erva.

As amostras apresentavam também um amargo característico. Contudo, este atributo está de acordo com o observado por Vaz (2011) para os azeites da cultivar Cobrançosa provenientes da região de Mirandela.

1.15. Referências Bibliográficas

Alves, M. L. V. (2011). Caracterização e estrutura genética da cultivar de oliveira ‘Cobrançosa’ e a sua relação com o zambujeiro. Lisboa: Faculdade de Ciências. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia, pp. 4.

Amaral, S., J., Mafra, I. e Oliveira, P.P, M. Beatriz. (2010). Characterization of three portuguese varietal olive oils based on fatty acids, triacylglycerols, phytosterols and vitamin E profiles: Application of chemometrics. In: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson (eds), Olives and olive oil in Health and disease prevention. Oxford: Academic Press, pp. 581-589.

Azeite, Casa do. (2012). Casa do Azeite. [online] 15 de Maio de 2012.
<http://www.casadoazeite.pt/DADOSSECTOR/tabid/56/Default.aspx>

Bacelar, E., Gonçalves, B., Montinho-Pereira, J., Correira, C. (2009). Botânica e Morfologia da Oliveira. In: Manuel A. Rodrigues e Carlos Correia (eds). Manual da Safra e Contra Safra do Olival. Bragança: Instituto Politécnico. Capítulo 1.

Cioffi, G., Pesca, M., Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and live pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121, 105-111.

COI, 2012. Internetional Olive Council. [Online] 13 de Maio de 2012.
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/147-microsite>

Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1545-1562.

- Gomes S., Bacelar E., Martins-Lopes P., Carvalho T., Guedes-Pinto H. (2012). Infection Process of Olive Fruits by *Colletotrichum acutatum* and the Protective Role of the Cuticle and Epidermis. *Journal of Agricultural Science*, 4(2), 104-114.
- Hajimahmoodi, M., Sadeghi, N., Jannat, B., Oveisi, M.R., Madani, S., Kiayi, M., Akrami, M.R., Ranjbar, A.M. (2008). Antioxidant activity, Reducing Power and Total Phenolic Content of Iranian Olive Cultivar. *Journal of Biological Sciences*, 8 (4): 779-783.
- Lopes, J., Pavão, F., Rodrigues M. Angelo. (2009). Colheita da azeitona. In: Manuel A. Rodrigues e Carlos Correia (eds). Manual da Safra e Contra Safra do Olival. Bragança: Instituto Politécnico. Capítulo 1.
- MADRP. (2007). Olivicultura – Diagnóstico Setorial. Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa: s.n., 2007.
- Morelló, J.R., Romero, P.M., Ramo,T., Motilva, M.J. (2005). Evaluation of L. phenylanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Food Science*, 168, 65-72.
- Nabki, A., Issaoui, M., Kouba, N., Echbili, A., Hammami, M., Attia, N. (2010). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from to extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 711-715.
- Owen, RW., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, W., Spiegelhalder, Bartsh, H. (2004). Olives and olive oil in cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*, 13: 319-326.
- Pires, R.D. (2005). Estudo da Valorização Comercial do Azeite de Trás-os-Montes e Alto Douro. Instituto Politécnico de Bragança, 32-35.
- Seabra, R., Andrade, P., Valentão, P., Faria, M., Paice, A., Oliveira, M. (2010). Phenolic profile of portuguese olives: cultivar and geographics In: Victor R. Preedy and

Ronald Ross Watson (eds), Olives and olive oil in Health and disease prevention. Oxford: Academic Press, 177.

Servili, M. and Montero, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, European *Journal of Lipid Science and Technology* 104, 602-613.

Silva, S., Gomes, L., Leitão, Coelho, A.V, Vilas Boas, L. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science Techology Internacional*, 12(5): 385-396.

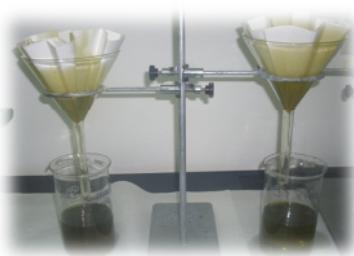
Tovar, M., Romero, M., Girona, J., Motilva, M. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 892-898.

Tuck, K. e Hayball, P. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636-644.

Vaz, M. (2011). Azeite de Trás-os-Montes: Influência da localização do olival e das cultivares nas características dos azeites. (2nd Edition). Instituto Piaget, Lisboa, 10-142.

Vinhas, A., Ferreres, F., Silva, B., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, A. J., Oliveira B. M., Seabra, M. R., Andrade, B.P. (2005). Phenolic profiles of portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89, 561-568.

Visioli, F., Poli, A., Galli, C.(2002). Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65-75.



Capítulo II – 'Cobrançosa' olive oil and drupe: chemical composition in two ripening stages

Submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry

'Cobrançosa' olive oil and drupe: chemical composition in two ripening stages

Cláudia Sousa^{1*}, Diana Barreira¹, Maria Teresa Carvalho³, Alice Vilela², João Lopes⁴, Paula Martins-
Lopes² and Ana I. Barros¹

¹CQ- Chemistry Research Centre, Chemistry Department, University of Trás-os-Montes e Alto Douro,
5001-801 Vila Real, Portugal.

²Institute of Biotechnology and Bioengineering, Centre of Genomics and Biotechnology – University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal.

³ Instituto Nacional de Investigação Agrária, (INIAV.I.P), Elvas, Portugal.

⁴DRAPN- Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, 133, 5370-347, Mirandela, Portugal

* Corresponding author

Tel:+351259350283

Fax: +351259350480

15

16 **Abstract**

17 The olive drupe harvesting date affects the olive oil composition and organoleptic
18 characteristics. This work aimed to study the alterations found in the chemical composition and
19 organoleptic profiles of olive oil in two different ripening stages (semi-ripen and ripe stage) on
20 Cobrançosa olive cultivar. Six different Cobrançosa Clones were used, considering olive drupes
21 and olive oils. Antioxidant activity, phenolic compounds, *ortho*-diphenols and flavonoid content
22 were determined in all samples using both ripening stages. Olive oils were characterized by a
23 sensorial panel. The phenolic profile was determined using HPLC. The antioxidant activity
24 revealed to not be statically different between the two ripening stages in five olive drupe and
25 three olive oil samples. All chemical parameters presented a high correlation with antioxidant
26 activity. The sensorial parameters that were affected with ripening were herbaceous aroma and
27 flavor and, bitter taste that increased with the ripening.

28

29

30 *Keywords:* Olive oil, drupes, ripening stage, chemical composition, sensorial parameters

31 **Introduction**

32 Olive tree is mainly grown in the Mediterranean basin representing around 95% of
33 global area. Spain, Italy, Greece and Portugal are the main producers in the European
34 Union accounting for 76% of worldwide production.¹

35 In the Trás-os-Montes region, located in the Northeast of Portugal, olive is one of the
36 most economically important crops.² Mirandela county accounts for the largest olive
37 tree number (\pm 950.000) in the region. Cobrançosa cultivar is present in 30% of the
38 olive groves and it is the second most cultivated.³

39 *Olea europaea* L. products, such as olive oil and olives, are very important in the
40 Mediterranean diet.⁴

41 Many epidemiological studies have demonstrated that the Mediterranean population
42 enjoys a healthy lifestyle with decreased incidence of degenerative diseases. These same
43 studies focus the importance of olives and olive oil consumption.^{5, 6} The benefits of
44 olive products seem to be intrinsically linked to the high monounsaturated fat content
45 (particularly the abundance of oleic acid in olive oil ranging 56 to 84% of total fatty
46 acids), and the presence of minor constituents as tocopherols and phenolic compounds.

47 ^{7, 8}

48 Phenolic compounds are secondary metabolites, with a great structural diversity, and an
49 essential part of human diet being considerably interesting due to their antioxidant
50 properties.^{9, 10} They exhibit a wide range of physiological properties, such as anti-
51 allergenic, anti-atherogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, anti-
52 thrombotic, cardioprotective and vasodilatory effects.¹⁰

53 Olive drupes contain high phenolic compounds concentration (1-3% of the fresh pulp
54 weight),¹¹ being responsible for important characteristics and properties such as color,
55 taste and texture.⁸ The most important class of phenolic compounds in olive drupes

56 includes phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids and secoiridoids.⁹ The phenolic
57 alcohols of olives are hydroxytyrosol and tyrosol, and are the most abundant.
58 Oleuropein and ligstroside are the predominant secoiridoids and verbascoside is a
59 hydroxycinnamic acid. The flavonoids include flavonol glycosides such as: luteolin-7-
60 *O*-glucoside, rutin and apigenin-7-*O*-glucoside.^{9, 11, 13, 14}

61 Olive oil obtained directly from olive fruit, using only mechanical extraction, can be
62 consumed without further treatments.^{3, 7, 12} In olive oil, the major phenolic compounds
63 identified and quantified belong to five different classes: phenolic acids (especially
64 derivates of benzoic and cinnamic acids); flavones (luteolin and apigenin), lignans ((+)-
65 pinoresinol and (+)-acetoxy pinoresol), phenyl-ethyl alcohols (hydroxytyrosol and
66 tyrosol) and secoiridoids (aglycone derivates of oleuropein and ligstroside).¹² Olive oil
67 is a natural product valued for its unique aroma and taste that is directly dependent on
68 the chemical profile.^{15, 16} Many factors affect olive oil quality: ripening stage,
69 environmental conditions, cultural practices, oil extraction method, storage condition,
70 sanitary stage of olive drupe and variety considered to be the most important,
71 influencing olive oil quality and sensory characteristics.²

72 Phenolic compounds confer a bitter and pungent taste to the olive oil. Phenolic acids
73 such as a phenol and cinnamic acid are responsible for the bitter sensation, while
74 secoiridoids confer the peculiar pungency.⁷ Although high phenol levels are present in
75 olive oils, they are responsible for the stability and for a strong fruity flavor, indicating a
76 high, but not necessarily the most preferred organoleptic quality of the oil.⁷

77 In this context, the aims were to study the alterations found in the chemical composition
78 of olive drupe and olive oil in two different ripening stages (semi-ripen and ripe stage)
79 on Cobrançosa olive cultivar. Olive oil samples were evaluated sensorial to understand
80 the effect that ripening has on its acceptance.

81 **Material and Methods**

82 *Reagents*

83 Folin-Ciocalteu's reagent, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulphonic acid
84 (ABTS), Trolox, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), 4-hydroxy-3-
85 methoxybenzoic acid (vanillic acid), *p*-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, catechin
86 from Sigma-Aldrich, formic acid (pro-analysis) and acetonitrile (HPLC gradient grade)
87 were purchased from Panreac.

88

89 *Olive drupe and olive oil samples*

90 Six Clones of Cobrançosa olive cultivar maintained in a field collection by the *Direção*
91 *Regional de Agricultura e Pescas do Norte* (DRAPN), Ministry of Agriculture,
92 Mirandela, Portugal, were used.

93 Olive drupes were collected in two maturity stages: semi-ripen and ripe. The semi-ripen
94 samples were collected in October (14/10/2011) and the ripe samples were harvested in
95 November (8/11/2011). The six genetically different 'Cobrançosa' Clones ¹⁷ were
96 chosen in accordance with previous studies and identified according to yield ¹⁸ and
97 antioxidant activity: two identified with high antioxidant activity and yield (Clone 80
98 and 85); two Clones with high antioxidant activity and low yield (Clone 14 and Clone
99 49); one Clone with low antioxidant activity and high yield (Clone 111); one Clone with
100 low antioxidant activity and yield (Clone 110).

101 The olive oil samples were prepared in the *Unidade Nacional de Investigação Agrária*
102 (INIAV.I.P), Elvas, Portugal.

103 Three kilos of fresh olive drupes were used for olive oil production, using the Abencor
104 system.

105

106

107 *Preparation of olive fruit extracts*

108 Olive samples (5 g) were macerated with 50 mL of a mixture of MeOH/H₂O (50:50)
109 and incubated at room temperature for 30 min. After, the supernatant was decanted and
110 extractions were repeated three times. The liquid phase was filtrated and subsequent
111 centrifuged at 9.000 rpm for 10 min. To remove the fat phase the mixture was washed
112 twice with hexane (50 mL) using a separatory funnel and the organic phase was
113 discarded. Three replicates per sample were performed. Each was introduced into a 200
114 mL round bottom flask, completing the volume of solution-sign up to capacity with
115 MeOH/H₂O (50:50).

116

117 *Preparation of olive oil extracts*

118 For the extraction of polar phenolic compounds, 4 mL of sample was weighed in a test
119 tube, followed by the addition of 2.5 mL of hexane and 2.5 mL of MeOH/H₂O (80:20)
120 mixture. The mixture was centrifuged for 10 min and at 60 rpm. The lower phase was
121 carefully discarded and reserved in a 10 mL volumetric flask. To the remaining mixture,
122 2.5 mL of hexane and 2.5 mL of MeOH/H₂O (80:20) was added and centrifuged for 10
123 min at 60 rpm. Once more the lower phase was discarded on the same volumetric flask.
124 This procedure has been repeated three times. For each olive oil sample triplicates were
125 made.

126

127 *Antioxidant activity determination*

128 The radical-scavenging activity was determined soon after extraction by the 2,2-azino-
129 bis(3-ethylbenzothiazoline)-6 sulphonic acid (ABTS) radical cation decolorization
130 assay.^{19, 20} For the assay, ABTS⁺ radical was prepared by mixing an ABTS stock
131 solution (7 mM in water) with 2.45 mM potassium persulfate. This mixture was allowed

132 to stand for 12-16 h at room temperature in the dark until reaching a stable oxidative
133 state. The ABTS⁺ solution was diluted with 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) to an
134 absorbance of 0.70±0.01 at 734 nm. The reaction was started by the addition of 25, 50,
135 100, 150 and 200 µL of the methanolic extract of the olives diluted conveniently to 2
136 mL of the diluted ABTS⁺ solution. ABTS⁺ bleaching was monitored at 734 nm and 25
137 °C for at least 30 min and the percentage of discoloration after 15 min was used as the
138 measure of antioxidant activity. The ABTS⁺ bleaching was proportional to the
139 concentration of the sample added to the medium. The antioxidant activity of the extract
140 was calculated as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) and was expressed
141 as mmoles of Trolox equivalents per kg of sample. All measurements were performed
142 in triplicate. A standard curve of the percentage of ABTS⁺ inhibition in function of
143 Trolox concentration (0.11 to 0.014 mM) was used for the calculations.

144

145 *Total phenolic content*

146 The content of total phenolic compounds in the olive samples was determined using
147 Folin-Ciocalteu reagent, with gallic acid as standard. This method is based on the
148 reduction of a phosphowolframate-phosphomolybdate complex by phenolics to blue
149 reaction products. 1 mL of diluted samples was mixed with 500 µL of Folin-Ciocalteu
150 reagent, 2 mL of 7.5 % sodium carbonate solution and 6.5 mL of water. The mixture
151 was shaken and the absorbance of the standards and samples was measured at 750 nm
152 after 30 min reaction at 70 °C in relation to a gallic acid standard curve. All
153 measurements were performed in triplicate. The results were expressed as milligrams of
154 gallic acid equivalents per gram of dry olive (mg GAE g⁻¹).

155

156

157 *Ortho-diphenol content*

158 *Ortho-diphenols* were measured colorimetrically at 370 nm after adding 1 mL 5%
159 (w/v) sodium molibdate in 50 % ethanol to the aliquots of the extract (4 mL). Gallic
160 acid served as a standard to prepare a calibration curve in the 5-200 mg range per gram
161 of solution.²¹ All measurements were performed in triplicate.

162 The *ortho*-diphenol content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per
163 gram of dry weight (mg GAE g⁻¹).

164

165 *Flavonoids content*

166 In a test tube 0.5 mL of sample-working solution and 150 µL of NaNO₂ 5 % were
167 introduced. After 5 min, 150 µL of AlCl₃ 10 % were added and 6 min after 1 mL of 1 M
168 NaOH was added. The mixture was shaken and the absorbance of the standards and
169 samples was measured at 510 nm in relation to a catechin standard curve. All
170 measurements were performed in triplicate. The results were expressed as milligrams of
171 catechin per gram of dry olive (mg catechin g⁻¹).

172

173 *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis*

174 RP-HPLC-DAD analysis was performed on a Dionex Ultimate 3000 apparatus (Dionex
175 Corporation) equipped with a photodiodes detector. The column used was a C-18
176 Teknocroma 250 cm in length X 4 mm in diameter and 5 mm particle (Teknocroma,
177 Barcelona). The mobile phase A was an aqueous solution of 5 % formic acid (used as
178 mobile phase to adjust the pH, due to their volatility characteristics and acidifying) and
179 mobile phase B methanol, both HPLC quality laboratories Panreac. The ultra-pure water
180 was obtained from a purification system from Milli-Q Millipore brand. The gradient
181 used was 5 % B, 5 min, gradient to 60 % B in 60 min, 60 % B 5 min, 5 % B, 5 min. The

182 photodiodes array detector was operated between 200-600 nm, and TLC was recorded
183 at 520 nm. The sample volume injected was 50 µL and the flow was 1 mL min⁻¹, and
184 the analysis performed at 35 °C.

185

186 *Sensory Analysis*

187 The sensory analyses were performed in accordance with the standard ISO 8589:2007
188 (Portuguese standard NP 4258:1993).²² Sensory evaluation was performed in a room
189 with controlled environmental and the material necessary for each task. Twelve olive
190 oils were evaluated by a trained panel of twelve elements, belonging to the panel of
191 tasters trained in ECVA-UTAD (DeBA-Enologia). Samples were served at room
192 temperature, in tasting glasses, coded with a three digit code, with a random order of
193 presentation. With the samples, were also provided bread and granny smith apple slices
194 for cleaning the palate. It was carried out a Quantitative Descriptive Analysis (QDA),
195 using proof sheets with attributes adapted from Regulation (CEE) Nº 2568/91.²³ We
196 evaluated the following attributes: fruity aroma, herbaceous aroma, almond aroma,
197 vinegar aroma, rancid aroma, fruity flavor, herbaceous flavor, almond flavor, metallic
198 flavor, earthy flavor, sweet taste, green olives sensation, spicy sensation, vinegar
199 sensation, metallic sensation and bitter taste, with a structural scale ranging from 1 to 6
200 (ISO 4121:2003).²⁴

201

202 *Statistics*

203 The four variables antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids and *ortho*-
204 diphenols were statistically analysed by ANOVA, and Scheffe's probability test was
205 performed using the software program "StatView Version 4.5". Differences were
206 considered significant at the 5 % level when Scheffe's probability test was applied.

207 The results of sensory evaluation were submitted to Analysis of Variance (ANOVA),
208 Duncan Test with 5 % significance to compare averages, Principal Component Analysis
209 (PCA) and Cluster Analysis (the average Euclidean distance, method UPGMA –
210 unweighted pair-group average). All analyses were performed using the software
211 STATISTICA 2010 (StatSoft Inc., 2010).

212

213 **Results and Discussion**

214

215 *Comparison of antioxidant activity, phenolic compounds, ortho-diphenols and*
216 *flavonoids in semi-ripe and ripe stage of olive drupes.*

217 Olive drupes have been used for direct consumption and oil production, for centuries.

218 One of the major reasons is related to the high amount of polyphenolic compounds
219 present in olive flesh when compared with the majority of other fruits.²⁵

220 In the present work the phenolic modifications and the antioxidant activity in olive
221 drupes of ‘Cobrançosa’ Clones from different yield production in two different stages of
222 ripening (semi-ripen and ripe stage) were studied. In Table 1, the results of these
223 parameters for olive drupe samples are presented.

224 The results of antioxidant activity in semi-ripen olive drupe samples ranged values
225 between 56.59 ± 4.39 (Clone 110) and 138.87 ± 6.81 mmol trolox kg⁻¹ (Clone 80) and
226 for the ripe stage ranged values of 72.14 ± 6.33 (Clone 110) to 139.32 ± 21.33 mmol
227 trolox kg⁻¹ (Clone 85). The lowest antioxidant activity values were obtained in the same
228 Clone, Clone 110, in the two ripening stages; this Clone was characterized in a previous
229 study as having low yield and low antioxidant activity (*personal communication*). The
230 Clones that presented the highest antioxidant values in the two ripening stages were not

231 coincident; however both of them were previously characterized as having high yield
232 and high antioxidant activity.

233 There are many reports describing the antioxidant activity of olives, however, these are
234 not expressed in the same units and different methodologies have been applied. In
235 accordance to the results presented by Boskou et al. (2006) the antioxidant activity
236 depends on the cultivar studied.⁴

237 Comparing the antioxidant activity for all the six Clones related to semi-ripen and ripe
238 stage, there are no significant differences ($p>0.05$) between the two ripening stages of
239 Clones 14, 49, 80, 110 and 111, being the only exception Clone 85 ($p<0.05$).

240 Total phenolic content, was determined by the Folin-Ciocalteu reagent, with gallic acid
241 as standard ($Y= 0.0153x + 0.0813$, $r^2= 0.9982$). For semi-ripen and ripe stages the
242 results ranged from 16.95 ± 0.82 (Clone 110) to 29.72 ± 0.95 mg GAE g⁻¹ (Clone 80)
243 and from 21.78 ± 0.90 (Clone 110) to 33.96 ± 1.79 mg GAE g⁻¹ (Clone 14),
244 respectively. The phenolic compounds behaved similar to the antioxidant activity, with
245 Clone 110 presenting the lowest values in both ripening stages. The amount of total
246 phenolic compounds presented similar results to those obtained in different Iranian
247 cultivars, 18.41 ± 0.308 and 29.97 ± 0.361 mg GAE g⁻¹.²⁶

248 Tovar et al. (2002) reported total polyphenol contents in olive cultivar Arbequina (g
249 caffeic acid kg⁻¹ dry weight) between 85.81 ± 7.35 in the green stage and 60.35 ± 2.83 in
250 the ripe stage, with a decrease in phenolic compounds between the maturation stages.²⁵

251 However, in our results the behavior varied with the Clones where: three Clones (14; 85
252 and; 110) increased their total phenolic compounds, with significant differences
253 between maturation stages ($p<0.05$); two Clones (80 and 111) maintained similar levels
254 of total phenolic compounds ($p>0.05$) and; one Clone (49) presented a significant
255 decrease on total phenolic compounds with drupe ripening.

256 However, Tovar et al. (2002) obtained non-significant differences between semi-ripen
257 and ripe stage, considering total phenolic compounds, as was observed for Clones 80
258 and 111.²⁵

259 The *ortho*-diphenols content varied between 13.61 ± 1.24 (Clone 110) and 41.65 ± 3.68
260 mg GAE g⁻¹ (Clone 49) for the semi-ripen drupes and 15.84 ± 0.76 (Clone 110) to 40.76
261 ± 6.81 mg GAE g⁻¹ (Clone 80) in the ripe stage.

262 Comparing the levels of *ortho*-diphenols between both stages, there are two Clones that
263 are not significantly different (85 and 110); whereas Clones 49 and 111 present a
264 significant decrease in the levels of *ortho*-diphenols between maturation stages.
265 Considering Clones 14 and 80 the amount of *ortho*-diphenols increased with
266 maturation. Only Clones 85 and 110 presented similar results with previous reports in
267 Arbequina olive cultivar (Tovar et al., 2002) with non-significant differences between
268 maturation stages.²⁵

269 The flavonoid content in the semi-ripen drupe samples was between 5.08 ± 0.46 (Clone
270 110) and 21.56 ± 1.58 mg catechin g⁻¹ (Clone 49) and in the ripe stage the values varied
271 between 7.24 ± 0.78 (Clone 110) and 26.15 ± 1.47 mg catechin g⁻¹ (Clone 14).
272 Flavonoid profiles behaved similar to the phenolic compounds; being the exception
273 Clone 111 that presented a significant decrease with maturation.

274 The coefficient of determination between total antioxidant activity and total phenolic
275 compounds is $R^2=0.7667$, suggesting that 87.56 % of the ‘Cobrançosa’ drupe
276 antioxidant activity results from the contribution of phenolic compounds. The *ortho*-
277 diphenols and the flavonoids are responsible for 86.83 % ($R^2=0.754$) and 82.34 %
278 ($R^2=0.6781$) of antioxidant activity, respectively (Fig. 1).

279

280 Comparison of antioxidant activity, phenolic compounds, *ortho*-diphenols and
281 flavonoids in semi-ripen and ripe stage of olive oil.

282 Many of the beneficial effect of olive oil is attributed to the phenolic compounds, which
283 have a great effect on the stability, sensory and nutritional characteristics and are
284 present in olive oils in a considerable amount.²⁶

285 The olive drupe harvesting date is very important once it interferes in the composition,
286 color and organoleptic characteristics of olive oil. When the harvesting date is
287 anticipated some advantages may be found in comparison to late harvest, such as olive
288 tree has shorter fructification period allowing more time to recover its vegetative state;
289 olive oils are fruitier, with lower acidity and less fruit lost due to over-ripening.²⁷

290 The results for antioxidant activity, phenolic compounds, *ortho*-diphenols and
291 flavonoids for olive oils are presented in Table 2 and report the different ripening stages
292 and Clones used.

293 The antioxidant activity values obtained in these samples ranged from 3.01 ± 0.12
294 (Clone 110) to 7.49 ± 0.26 mmols trolox kg⁻¹ (Clone 49) in the semi-ripen stage, and
295 2.67 ± 0.15 (Clone 110) to 6.54 ± 0.56 mmols trolox kg⁻¹ (Clones 80) in the ripe stage.

296 All our olive oil samples presented higher antioxidant activity values than those
297 obtained in two Tunisian cultivars, which ranged between 0.61 ± 0.09 and 2.42 ± 0.12
298 mmol trolox kg⁻¹.⁶ These can be related to the cultivar used revealing that Cobrançosa
299 may be considered an interesting cultivar to be used in olive oil in order to increase
300 antioxidant activity, and therefore stability, flavor and color.

301 Between semi-ripen and ripe stage there are no significant differences ($p>0.05$) in three
302 Cobrançosa Clones (80, 110 and 111), presenting the exact behavior that was found in
303 the respective olive drupe samples. In these cases there seems to be no negative effect in

304 harvesting the olive drupes earlier, therefore avoiding both fruit loss and possible
305 fungus infections related to late harvesting.²⁸

306 Overall, total phenolic compounds ranged values between 0.39 ± 0.01 and 1.72 ± 0.02
307 mg GAE g⁻¹. The results obtained in the olive oil samples are higher than those obtained
308 by Nabki et al. (2010) in two cultivars: Chétoui (0.395 mg GAE g⁻¹) and Chemlati
309 (0.158 mg GAE g⁻¹).⁶

310 The amount of polyphenols in olive oil samples decreased significantly between the
311 semi-ripen and the ripen stage in all the Clones with the exception of Clone 14 that
312 maintained similar levels ($p>0.05$). The results of phenolic compounds ranged values
313 between 0.74 ± 0.01 (Clone 110) and 1.72 ± 0.02 (Clone 49) and, 0.39 ± 0.01 (Clone
314 110) to 1.46 ± 0.10 mg GAE g⁻¹(Clone 80) for semi-ripen and ripe stage, respectively.

315 In relation to *ortho*-diphenol content obtained ranged values between 0.37 ± 0.008
316 (Clone 110) to 0.83 ± 0.02 (Clone 80) for semi-ripen stage and 0.40 ± 0.02 (Clone 110)
317 to 0.82 ± 0.05 (Clone 80) for ripe stage. The *ortho*-diphenol content in the Clones
318 presented different behaviors. Four Clones (49, 80, 110 and 111) were non-significant
319 different considering the maturation stages; and two Clones (85 and 14) presented
320 significant differences among the stages. However, Clones 85 and 14 presented opposite
321 behaviors, Clone 14 an increase of *ortho*-diphenols content was observed with the
322 maturation stage; whereas Clone 85 presented a decrease. The *ortho*-diphenol content
323 obtained in the Cobrançosa olive oil samples are higher when compared with the values
324 obtained for cultivars Chétoui (0.1334 mg GAE g⁻¹) and Chemlati (0.05319 mg GAE g⁻¹).⁶

325 The flavonoids contents are not significant between both stages for all the Clones, with
326 the exception of Clone 49. The values ranged 0.78 ± 0.01 (Clone 110) to 1.96 ± 0.03 mg

328 catechin g⁻¹ (Clone 49) for semi-ripen stage and, 0.65 ± 0.03 (Clone 110) to 1.7 ± 0.13
329 (Clone 80) mg catechin g⁻¹ for the ripe stage.

330 When comparing with the results obtained in the olive drupe samples, as expected, olive
331 oil produced from Clone 110 presented the lowest values for all the parameters. The
332 highest values were observed in the olive oils from Clones 49 and 80, independently of
333 the ripening stage.

334 The coefficient of determination between total antioxidant activity and total phenolic
335 compounds in olive oil samples is R²=0.932, these results suggest that 96.54 % of the
336 antioxidant activity of ‘Cobrançosa’ olive oil results from the contribution of phenolic
337 compounds *ortho*-diphenols and flavonoids are responsible for 97.18 % (R²=0.9445)
338 and 96.24 % (R²=0.9263) of antioxidant activity, respectively (Fig. 2).

339

340 *Phenolic profile of olive drupe Clones*

341 The phenolic profiles of the olive drupes were analyzed by RP-HPLC-DAD. Three
342 identification strategies were used for polyphenolic profile characterization in the
343 ‘Cobrançosa’ olive Clones.

344 When reference compounds were available as standards, the presence or absence of a
345 particular polyphenolic compound was assessed by comparison of the retention time
346 and UV-vis spectra. Secondly, when reference compounds were not available,
347 confirmation was performed by examining the UV-vis spectra in comparison with the
348 retention time and UV-vis spectra available in the literature.^{29,30} Thirdly, major peaks in
349 the chromatograms that were not identified by either of the other screening processes
350 were classified according to the UV–vis spectra.

351 In table 3 are presented the main compounds identified in ‘Cobrançosa’ olive drupe that
352 comprehend phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids and secoiridoids.

353 The different Clones studied presented a similar phenolic profile, however the identified
354 compounds presented different area percentages.

355 Some phenolic alcohols, as hydroxytyrosol, are present in all the Clones with similar
356 percentage area values not differing among semi-ripen and ripe stage. Clone 110 is an
357 exception, once it presents higher values when compared with the other Clones; it also
358 presents higher percentage area in semi-ripen stage when compared with the ripe stage.

359 According to Vinhas et al. (2005) verbascoside is the main hydroxycinamic acid olive
360 drupe derivate.⁹ In the present work, the Clones analyzed presented different values of
361 percentage area, ranging between 1.92 % for Clone 110 in semi-ripen stage to 35.75 %
362 in Clone 14 in the same ripening stage. Overall the value of percentage area decreased
363 with the ripening stage, but in Clone 85 there is an increase of verbascoside.

364 Some compounds detected in the studied samples have not been identified once their
365 retention time and the UV-vis spectra are not in accordance neither with the literature
366 nor with the standard samples. One of these compounds, with a retention time of 28.00
367 min is only detected in the ripe stage of Clone 14, and presents a considerable
368 percentage of area (10.94 %) being one of the major compounds identified in this
369 Clone.

370 Rutin has been identified in all the Clones, but only in the ripe stage. However, in
371 accordance to the results obtained by Morelló et al (2005), this flavonoid has been
372 described as being present in all the maturation stages.³¹ Oleuropein and ligstroside are
373 the most important secoiridoids in olive fruit pulp.³¹

374 In relation to ligstroside, it is identified in all the Clones in a low percentage of area,
375 being Clone 110, once again, an exception, once its percentage is one of the highest for
376 this Clone. Another interesting behavior of this Clone is related to the oleuropein

377 content that was absent in the olive drupes, although it was identified in all the other
378 Clones studied in the semi-ripening stage.

379 Another unknown compound, with a retention time of 68.65 min, is present with a
380 significant higher percentage of area in Clone 110 when compared with the other
381 Clones.

382

383

384

385 *Phenolic profile of olive oil Clones*

386 The olive oil samples' phenolic profiles considering the different Clones in semi-ripen
387 and ripe stage are presented in table 4.

388 The different Clones have a similar phenolic profile between both ripening stages once
389 the phenolic compounds identified are similar, as are the relative areas with the
390 exception of Clone 110. In this Clone the flavonoid luteolin-7-*O*-glucoside is higher
391 when compared with the other Clones; nevertheless the compounds identified with
392 retention times of 41.43 and 45.70 min in this Clone presented lower values for
393 percentage of areas in both ripening stages.

394 The compounds with the major percentage of area are identified with the higher values
395 of retention times. This fact doesn't allow their identification, once they aren't
396 comparable neither with available standards nor with literature.

397

398 *Organoleptical evaluation of olive oils*

399 The results obtained showed that the different olive oil samples, from cultivar
400 Cobrançosa from the Mirandela region, in two stages of ripening are significantly
401 different ($p<0.05$, Table 5), organoleptically, in the organoleptic parameters as
402 herbaceous aroma, herbaceous flavor and bitter taste.

403 Analyzing table 5, it appears that, the negative characteristics of monovarietal olive oils
404 (rancid aroma, vinegar aroma, metallic flavor, earthy flavor, vinegar sensation and
405 metallic sensation) described in Regulation (CEE) Nº 2568/91 were found in our
406 samples at a minimal level.²³

407 With Cluster analysis, figure 4, it was possible to observe the formation of two major
408 groups divided by their maturation stage: group 1 (Clones 14 to 111 - olive oil samples
409 in a complete mature stage), and group 2 (Clones 14 to 111- olive oil samples in semi-
410 ripe stage of maturation).

411 The PCA showed two interpretable components, explaining together 88 % of the total
412 variation in sensory attributes. The attributes that most contribute for principal
413 component 1 were: herbaceous aroma, herbaceous flavor and metallic sensation. For
414 principal component 2 were: bitter taste and spicy sensation (Fig. 5).

415 Among all the olive oil samples evaluated, Clone 110 in ripe stage was the preferred by
416 the tasters. This sample has a medium value for bitter taste, high medium value for
417 herbaceous aroma, and a low medium value for herbaceous flavor. In accordance with
418 Vaz (2011) the olive oils from Mirandela region have a bitterness characteristic
419 sensation, what is in agreement with our olive oil samples.³

420

421 **Conclusions**

422 Overall the antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids and *ortho*-diphenol
423 contents of the olive drupes and olive oil samples of Cobrançosa Clones were different.
424 Although they presented a similar chemical profile using HPLC, the areas of the
425 identified compounds were different.

426 The ripening stage does not affect overall the chemical composition of the olive drupes
427 studied. However, the olive oils behave in a mixed way considering these parameters

428 and the sensorial effect that the olive oils produced in the tasters. Overall the antioxidant
429 activity, phenolic content, *ortho*-diphenols and flavonoids decrease with the ripening in
430 olive oil samples, producing an higher herbaceous flavor and aroma, and bitter taste.

431 Therefore, in general the fact that olive growers harvest their drupes earlier does not
432 seem to affect the quality and acceptance of the olive oils. Thus, early harvesting can
433 avoid some olive drupe fungal infection, which can appear with the first rainfall,
434 affecting both olive oil yield and quality.

435 Considering the results obtained in this work and in a previous work the selection of
436 Cobrançosa Clones 80 and 85 is advisable once these two Clones presented the most
437 interesting features considering: high antioxidant activity values and high yield,
438 independently of maturation stage.

439

440

441

442 Table 1. Comparison between antioxidant activity, phenolic compounds, *ortho*-diphenols and flavonoids
 443 content (dry weight) of six Clones olive fruits of Cobrançosa cultivar in two ripening stages.

Cobrançosa Olive fruits	Picking Date	Water content (%)	Antioxidant activity (mmoles trolox kg ⁻¹)	Phenolic Compounds (mg GAE g ⁻¹)	<i>Ortho</i> - diphenols (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoids (mg catechin g ⁻¹)
Clone 14	14/10/11	50.60	103.5±7.95 ^b c	22.30±1.15 ^b	32.51±0.71 ^d	13.92±0.13 ^c
	08/11/11	49.49	119.89±3.54 ^{cde}	33.96±1.79 ^g	40.02±0.60 ^c	26.15±1.47 ^h
Clone 49	14/10/11	52.45	126.05±21.19 ^{ef}	28.78±2.04 ^{de}	41.65±3.68 ^d	21.56±1.58 ^g
	08/11/11	53.50	120.70±12.74 ^{de}	25.51±2.55 ^c	32.31±1.51 ^c	18.52±1.69 ^{de}
Clone 80	14/10/11	54.60	138.87±6.81 ^{ef}	29.72±0.95 ^e	33.49±2.58 ^c	19.27±0.61 ^{ef}
	08/11/11	55.00	130.57±0.84 ^{ef}	30.32±1.02 ^f	40.76±3.06 ^d	17.96±0.27 ^{de}
Clone 85	14/10/11	52.30	119.78±6.81 ^{cde}	29.44±2.39 ^e	33.62±3.20 ^c	16.70±2.4 ^d
	08/11/11	57.70	139.32±21.33 ^f	32.68±0.67 ^{fg}	33.83±1.75 ^c	20.71±0.73 ^{fg}
Clone 110	14/10/11	46.60	56.59±4.39 ^a	16.95±0.82 ^a	13.61±1.24 ^a	5.089±0.46 ^a
	08/11/11	63.00	72.14±6.33 ^a	21.78 ±0.90 ^b	15.84±0.76 ^a	7.24±0.78 ^b
Clone 111	14/10/11	54.82	103.96±3.36 ^{bcd}	26.80±3.21 ^{cd}	34.15±4.47 ^c	20.88±0.32 ^{fg}
	00/11/11	54.40	99.89±1.47 ^b	25.57±0.81 ^c	26.77±0.31 ^b	17.12±2.42 ^d

445 Means ± SD of each variety followed by the same letter do not differ significantly by P = 0.05

446 Table 2. Comparison between antioxidant activity, phenolic Compounds, *ortho*-diphenols and flavonoids
 447 of six Clones olive oils of Cobrançosa cultivar in two ripening stages.

Cobrançosa Olive oil	Picking Date	Antioxidant activity (mmoles trolox kg ⁻¹)	Phenolic Compounds (mg GAE g ⁻¹)	<i>Ortho</i> -diphenols (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoids (mg catechin g ⁻¹)
Clone 14	14/10/11	5.19±0.07 ^c	1.33±0.04 ^e	0.63±0.01 ^c	1.45±0.06 ^{bc}
	08/11/11	5.89±0.29 ^{de}	1.41±0.08 ^{ef}	0.77±0.02 ^d	1.65±0.08 ^{cde}
Clone 49	14/10/11	7.49±0.26 ^f	1.72 ±0.02 ^g	0.82±0.02 ^d	1.96±0.03 ^{ef}
	08/11/11	6.37±0.45 ^g	1.41 ±0.07 ^{ef}	0.79±0.02 ^d	1.61±0.03 ^{cd}
Clone 80	14/10/11	6.52±0.24 ^f	1.70±0.008 ^g	0.83±0.02 ^d	1.9±0.05 ^{ef}
	08/11/11	6.54±0.56 ^f	1.46±0.107 ^f	0.82±0.05 ^d	1.7±0.13 ^{de}
Clone 85	14/10/11	5.56±0.35 ^b	1.39±0.07 ^{ef}	0.65±0.08 ^c	1.47±0.19 ^{cd}
	08/11/11	4.38±0.46 ^{cd}	0.94±0.08 ^c	0.54±0.04 ^b	1.46±0.52 ^{cd}
Clone 110	14/10/11	3.01±0.12 ^a	0.74±0.01 ^b	0.37±0.008 ^a	0.78±0.01 ^a
	08/11/11	2.67±0.15 ^a	0.39 ±0.03 ^a	0.40±0.02 ^a	0.65±0.03 ^a
Clone 111	14/10/11	4.63±0.70 ^b	1.11±0.14 ^d	0.53 ±0.09 ^b	1.20±0.19 ^b
	08/11/11	4.49±0.07 ^b	0.97±0.02 ^c	0.59±0.007 ^{bc}	1.20±0.008 ^b

448 Means ± SD of each variety followed by the same letter do not differ significantly by P = 0.05

449

450

451 Table 3. Peak Areas of Olive drupes Clones of cultivar Cobrançosa in two ripening stages

452

Peak nº	Retention Time (min)	Compounds	Picking Date	Clone 14	Clone 49	Clone 80	Clone 85	Clone 110	Clone 111
				% area	% área	% area	% area	% area	% área
1	6.72 ± 0.10	Unknown	14-10-2011	3.30	4.56	-	-	-	4.93
			08-11-2011	2.62	-	-	-	-	-
2	7.71 ± 0.10	Hydroxytyrosol	14-10-2011	1.73	2.26	3.76	2.74	7.80	2.32
			08-11-2011	1.61	1.09	3.99	2.10	4.09	2.06
3	14.06 ± 0.12	Tyrosol	14-10-2011	0.669	1.19	2.00	1.33	1.31	1.24
			08-11-2011	0.938	1.09	1.92	1.47	2.46	1.17
4	16.54 ± 0.14	Vanillic Acid	14-10-2011	-	0.56	-	-	1.07	-
			08-11-2011	0.35	0.64	-	-	-	-
5	25.942 ± 0.08	β -OH-acetoside diastereoisomer	14-10-2011	5.81	-	4.07	0.55	-	4.55
			08-11-2011	3.66	-	-	-	-	4.96
6	26.337 ± 0.11	β -OH-acetoside diastereoisomer	14-10-2011	4.35	5.50	4.72	5.35	-	4.64
			08-11-2011	2.74	6.75	4.73	4.91	-	4.61
7	27.73 ± 0.10	Verbascoside	14-10-2011	35.75	31.22	23.68	11.32	1.92	24.41
			08-11-2011	20.77	26.77	19.52	17.78	-	20.73
8	28.00	Unknown	14-10-2011	-	-	-	-	-	-
			08-11-2011	10.94	-	-	-	-	-
9	29.66 ± 0.17	Isoverbascoside	14-10-2011	2.815	4.11	4.23	3.58	5.91	2.87
			08-11-2011	1.731	4.75	2.75	3.91	5.96	2.23
10	30.62 ± 0.17	Luteolin - 7 - O - glucoside	14-10-2011	6.81	7.38	6.95	5.57	6.49	5.72
			08-11-2011	4.182	7.53	4.16	5.60	6.94	3.59
11	31.15 ± 0.20	3,4 - DHPEA-EDA	14-10-2011	11.46	11.00	14.00	7.29	8.09	9.99
			08-11-2011	5.97	31.38	2.475	1.80	-	3.349
12	31.70 ± 0.04	Rutina	14-10-2011	-	-	-	-	-	-
			08-11-2011	12.29	11.38	12.62	15.82	12.53	12.86
13	33.7 ± 0.18	Apigenin - 7 - O - glicoside	14-10-2011	6.97	7.71	10.10	9.54	8.43	8.75
			08-11-2011	3.46	3.37	2.16	3.958	2.13	4.41
14	34.31 ± 0.15	Oleuropein aglycone derivate	14-10-2011	1.27	-	-	1.82	-	-
			08-11-2011	-	2.47	-	1.73	-	-
15	34.68 ± 0.08	Oleuropein aglycone derivate	14-10-2011	1.49	1.01	2.00	1.11	-	-
			08-11-2011	1.14	2.40	1.36	1.94	2.83	0.82
16	35.57 ± 0.14	Oleuropein	14-10-2011	2.15	2.236	1.322	2.153	-	1.72
			08-11-2011	1.453	-	-	1.47	-	0.87
17	38.205 ± 0.12	Ligstroside	14-10-2011	1.09	1.42	2.00	1.52	11.82	1.42
			08-11-2011	0.51	2.465	1.23	2.79	7.18	2.46
18	68.65 ± 0.21	Unknown	14-10-2011	11.35	12.505	13.44	14.98	26.749	12.595
			08-11-2011	8.47	19.17	14.94	22.42	43.88	14.27

453

454

455 Table 4. Peak areas of Olive oils Clones of cultivar Cobrançosa in two ripening stages

456

Peack nº	Retention Time (min)	Compound	Picking Date	Clone 14	Clone 49	Clone 80	Clone 85	Clone 110	Clone 111
1	7.83 ± 0.01	Hydroxytyrosol	14-10-2011	1.32	1.33	1.05	0.83	1.27	1.17
			08-11-2011	0.92	0.97	0.84	0.93	-	0.37
2	11.50 ± 0.01	Unknown	14-10-2011	1.47	1.00	0.94	1.44	2.19	1.13
			08-11-2011	0.57	0.57	0.25	1.07	1.17	1.31
3	13.16 ± 0.06	Tyrosol	14-10-2011	0.57	0.47	-	0.72	0.80	0.59
			08-11-2011	0.35	0.32	1.77	2.39	0.78	0.51
4	15.18± 0.02	5 - chlorogenic acid	14-10-2011	1.10	1.03	2.20	2.10	-	3.53
			08-11-2011	2.35	2.15	2.10	2.77	5.36	3.00
5	30.52 ± 0.02	Luteolin - 7 - O - glucoside	14-10-2011	10.8	12.4	9.97	15.0	24.1	10.0
			08-11-2011	8.96	12.0	15.0	10.4	46.6	18.3
6	31.54± 0.03	3,4 - DHPEA-EDA	14-10-2011	12.3	9.39	12.54	1.70	4.13	17.9
			08-11-2011	9.06	7.28	7.24	12.1	-	1.35
7	32.24	Unknown	14-10-2011	-	-	3.41	-	-	-
			08-11-2011	-	-	-	-	-	-
8	33.23	Apigenine -7- O -glucoside	14-10-2011	-	-	-	-	-	-
			08-11-2011	-	-	-	-	2.31	-
9	35.25 ± 0.03	Oleuropein	14-10-2011	3.84	4.16	-	5.03	6.70	3.26
			08-11-2011	3.09	3.48	5.03	4.12	5.02	5.82
10	36.63 ± 0.05	Unknown	14-10-2011	9.05	4.88	6.50	0.61	0.80	9.22
			08-11-2011	4.76	3.87	0.61	7.03	-	0.51
11	39.97 ± 0,011	Ligstroside	14-10-2011	0.98	0.84	0.95	-	-	2.01
			08-11-2011	2.88	2.29	-	1.07	-	-
12	41.43±0.03	Unknown	14-10-2011	36.5	43.0	38.0	51.6	28.46	29.07
			08-11-2011	45.2	46.5	51.6	33.9	9.028	43.65
13	45,70 ±0,03	Unknown	14-10-2011	9.79	11.4	10.5	10.8	2.67	6.19
			08-11-2011	11.08	10.7	10.8	11.5	0.66	9.39
14	68.19± 0.02	Unknown	14-10-2011	11.4	7.96	8.68	7.69	22.19	13.01
			08-11-2011	9.51	8.75	7.69	11.7	23.32	12.21
15	71.36 ± 0.05	Unknown	14-10-2011	-	-	3.08	-	4.468	1.23
			08-11-2011	-	-	-	-	-	-

457

458

459

460

461

462

463 Table 5. Sensory attributes (average) found in olive oil samples evaluated sensorially.

Attributes	Olive oil Clones						08/11/2011					
	14	49	80	85	110	111	14	49	80	85	110	111
Fruity aroma	2.7 ^a	2.8 ^a	2.7 ^a	2.6 ^a	3.2 ^a	3.0 ^a	2.5 ^a	2.6 ^a	2.7 ^a	2.5 ^a	2.6 ^a	3.2 ^a
Herbaceous aroma	2.3 ^{a,b}	2.0 ^b	2.6 ^{a,b}	2.9 ^{a,b}	3.3 ^a	3.1 ^a	6.4 ^e	6.3 ^{d,e}	5.3 ^{c,d}	5.8 ^{c,d,e}	5.1 ^c	4.9 ^c
Almond aroma	1.7 ^a	1.8 ^a	1.7 ^a	1.7 ^a	1.7 ^a	1.8 ^a	1.7 ^a	1.8 ^a	1.8 ^a	1.8 ^a	1.9 ^a	2.1 ^a
Vinagar aroma	1.5 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	1.5 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.6 ^a	1.5 ^a
Rancid aroma	1.5 ^a	1.5 ^a	1.3 ^a	1.2 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.2 ^a	1.3 ^a	1.2 ^a
Fruity flavor	2.4 ^a	2.1 ^a	2.3 ^a	2.4 ^a	2.7 ^a	2.5 ^a	2.5 ^a	2.8 ^a	2.1 ^a	2.1 ^a	2.7 ^a	2.5 ^a
Herbaceous flavor	3.8 ^{a,b}	3.5 ^a	4.7 ^{a,b,c}	5.0 ^{a,b,c}	4.2 ^{a,b,c}	4.7 ^{a,b,c}	5.6 ^c	5.5 ^c	4.7 ^{a,b,c}	5.3 ^{b,c}	3.8 ^{a,b}	4.8 ^{a,b,c}
Almond flavor	2.6 ^a	2.1 ^a	2.1 ^a	2.2 ^a	2.2 ^a	2.3 ^a	2.3 ^a	2.3 ^a	2.3 ^a	2.3 ^a	2.2 ^a	2.3 ^a
Metalic flavor	2.0 ^a	2.1 ^a	1.5 ^a	2.0 ^a	2.3 ^a	2.2 ^a	2.4 ^a	2.4 ^a	2.2 ^a	2.2 ^a	2.1 ^a	2.4 ^a
Earthy Flavor	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a	1.4 ^a	1.3 ^a
Sweet taste	1.4 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.6 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.3 ^a	1.6 ^a	1.4 ^a
Bitter taste	4.7 ^{a,b}	5.2 ^{a,b}	4.5 ^{a,b}	4.9 ^{a,b}	4.1 ^a	4.8 ^{a,b}	5.8 ^b	5.2 ^{a,b}	5.0 ^{a,b}	5.3 ^{a,b}	3.8 ^a	4.5 ^{a,b}
Spicy sensation	3.6 ^a	4.1 ^a	3.8 ^a	4.4 ^a	3.7 ^a	3.3 ^a	3.6 ^a	3.3 ^a	3.3 ^a	3.8 ^a	3.1 ^a	3.6 ^a
Vinegar sensation	1.8 ^a	1.7 ^a	1.8 ^a	2.0 ^a	1.6 ^a	1.7 ^a	1.9 ^a	1.8 ^a	1.6 ^a	1.7 ^a	1.6 ^a	1.6 ^a
Metallic sensation	2.0 ^a	1.9 ^a	1.6 ^a	2.3 ^a	1.8 ^a	2.1 ^a	2.3 ^a	2.8 ^a	2.3 ^a	2.4 ^a	2.2 ^a	2.4 ^a
Green olives sensation	3.6 ^a	3.3 ^a	3.8 ^a	3.6 ^a	3.3 ^a	3.4 ^a	3.3 ^a	3.8 ^a	3.2 ^a	3.1 ^a	3.0 ^a	3.3 ^a

464

465 Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly by Duncan test ($P < 0.05$).
466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

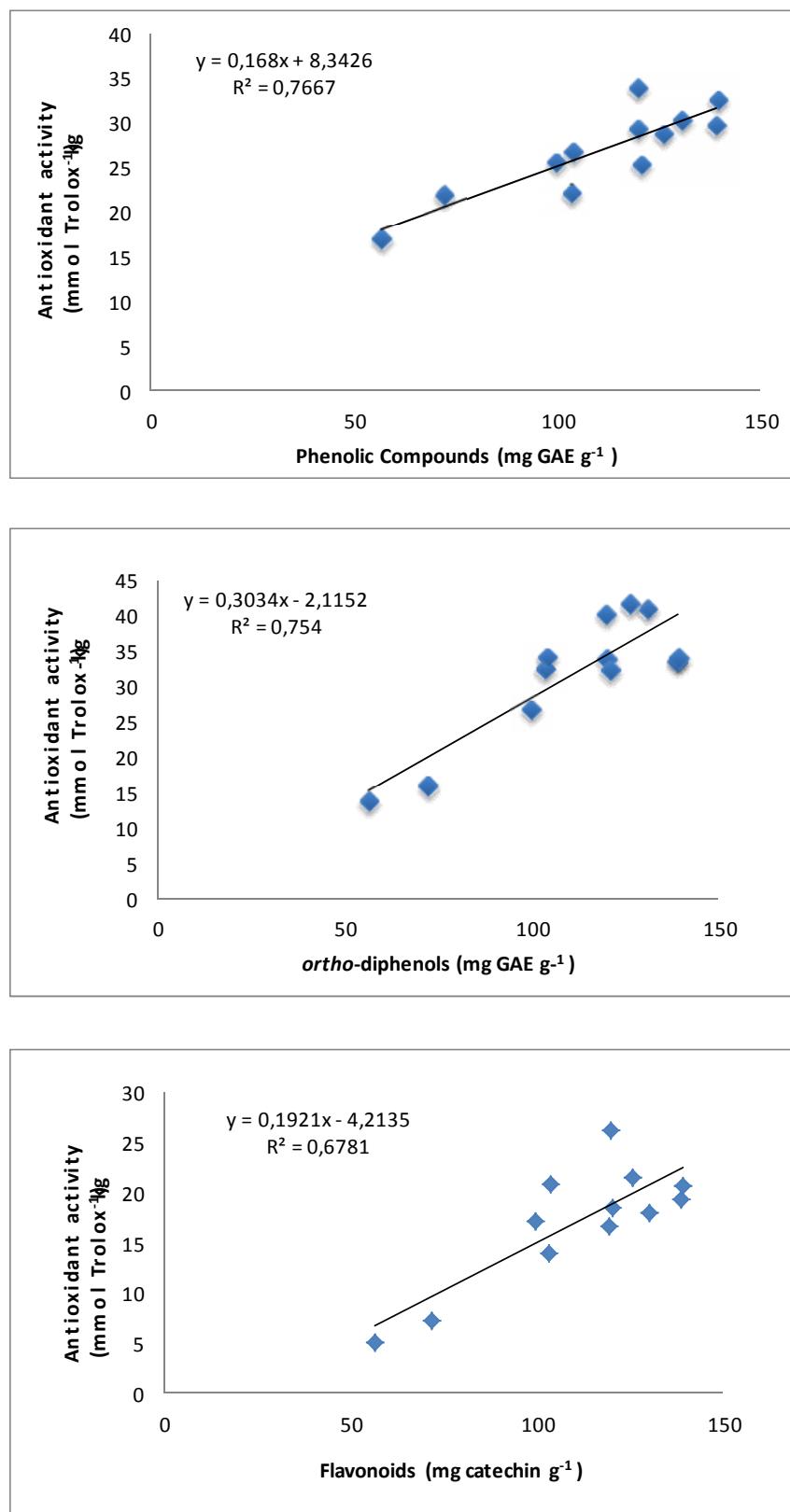
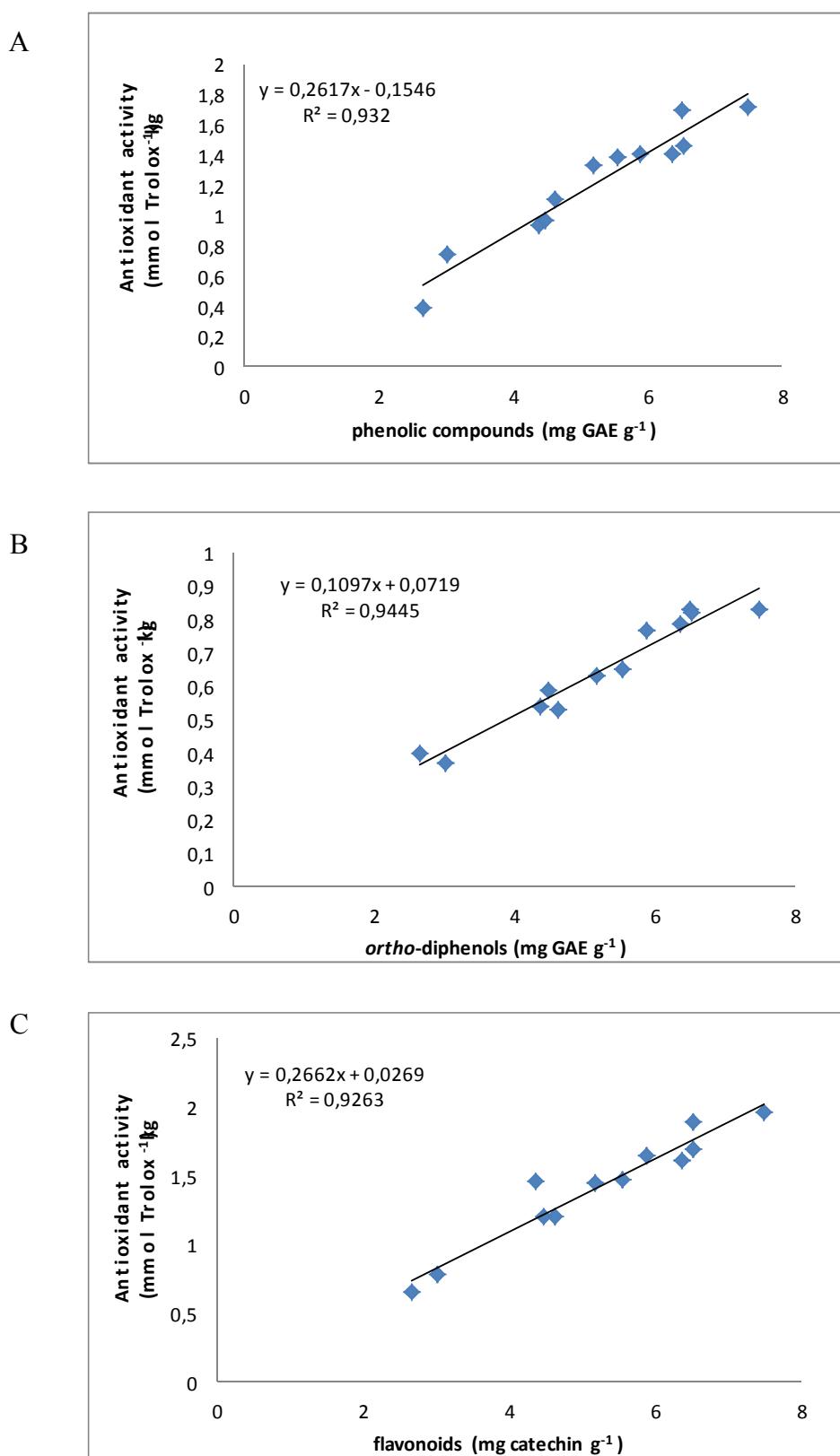


Figure 1. Relationship between (A) phenolic compounds and antioxidant activity (B) *ortho*-diphenols and antioxidant activity (C) flavonoids and antioxidant activity.



546 Figure 2. Relationship between (A) phenolic compounds and antioxidant activity (B) *ortho*- diphenols
 547 and antioxidant activity (C) flavonoids and antioxidant activity

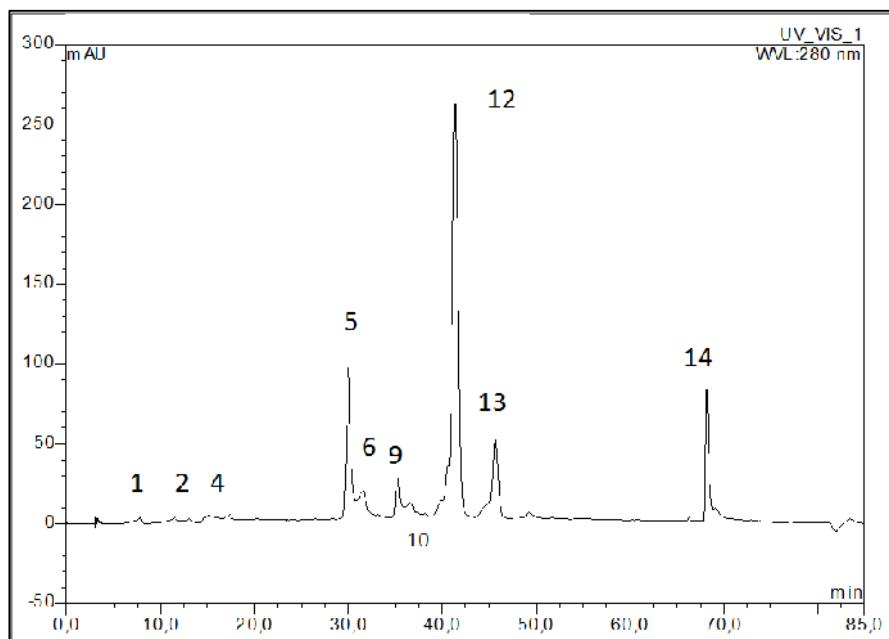
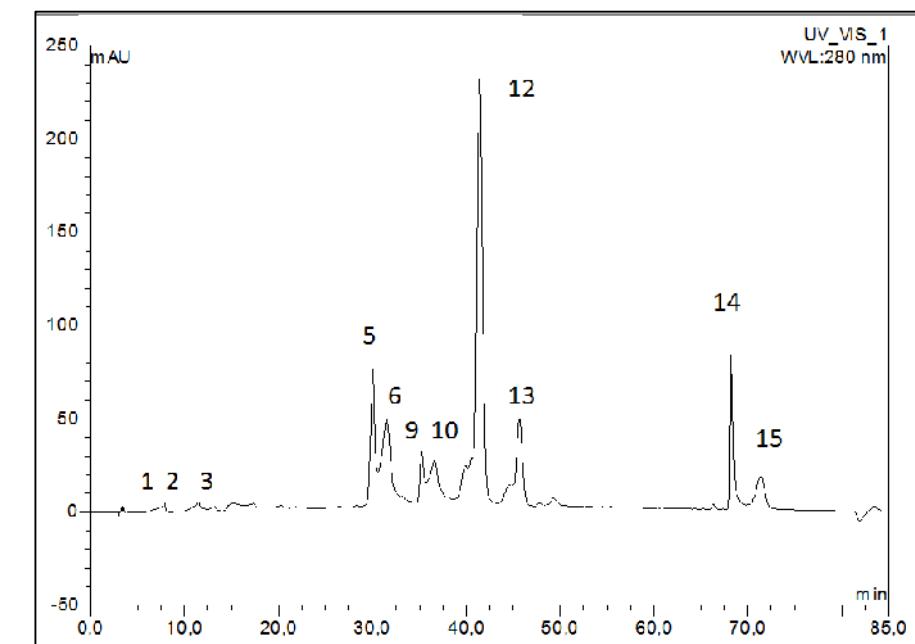
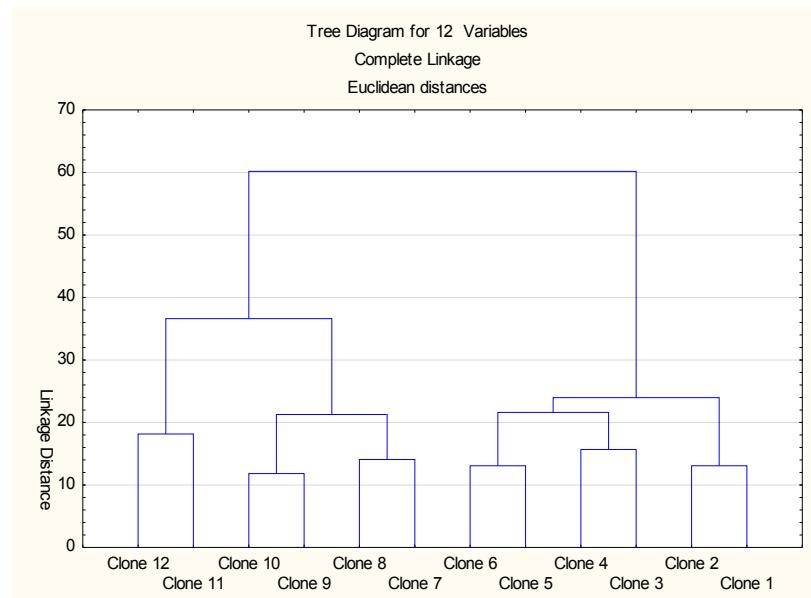


Figure 3. Polyphenolic chromatographic profiles (280 nm) of the Cobrançosa olive oils in two ripening stages. A) semi-ripen B) Ripe stage

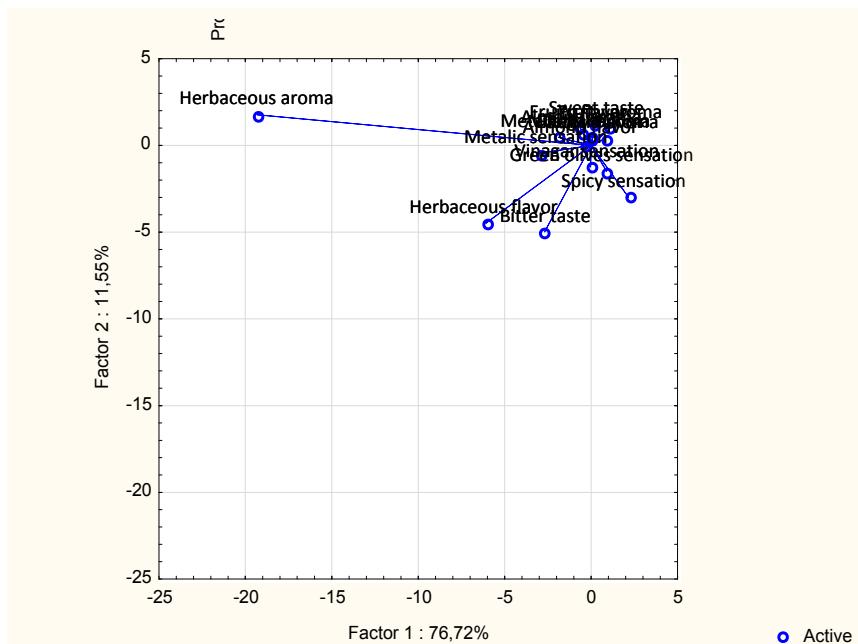
1- Hydroxytyrosol; 2 Unknown -; 3- Tyrosol; 5-Luteolin-7-O-glucoside; 6-3,4-DHPEA-EDA; 9-Oleuropein; 10; 12; 13; 14 e 15-Unknown



604

605 Figure 4. Phenogram obtained by cluster analysis after sensory analysis of twelve olive oil samples in two
606 different ripening stages.

607



608

609 Figure 5. Cov – PCA projection of the sensory attributes evaluated in olive oil samples in two ripening
610 stages.

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

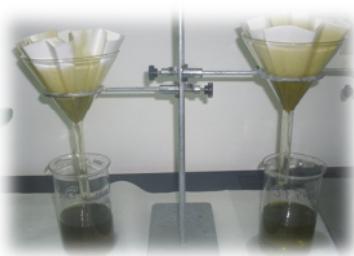
622

- 623 **References**
- 624
- 625 [1] - Lopes, J. Polinização em oliveira cvs. Galega e Cobrançosa: avaliação do
626 vingamento em ensaios de polinização controlada e do efeito da aplicação de um
627 bioestimulante. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. Master dissertation. **2011**, 2-5.
- 628 [2] - Amaral, S. J.; Mafra, I.; Oliveira, M.B.P.P. Characterization of three portuguese
629 varietal olive oils based on fatty acids, triacylglycerols, phytosterols and vitamin E
630 profiles: Application of chemometrics. In: *Olives and olive oil in Health and disease*
631 prevention; Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson (eds), Oxford: Academic Press.
632 **2010**, pp. 581-589.
- 633 [3] - Vaz, M. *Azeite de Trás-os-Montes: Influência da localização do olival e das*
634 *cultivares nas características dos azeites*. (2nd Edition). Instituto Piaget, Lisboa. **2011**,
635 10-142.
- 636 [4] - Boskou, G.; Salta, F.N.; Chrysostomou, S.; Mylona, A.; Chiou, A.; Andrikopoulos,
637 N.K. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from Greek market. *Food*
638 *Chem.* **2008**, 94, 558-564.
- 639 [5] - Owen, W.R.; Giacosa, A.; Hull, E. W.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Spiegelhalder,
640 B.; Bartsh, H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* **2004**, 13,
641 319-326.
- 642 [6] - Nabki, A.; Issaoui, M.; Kouba, N.; Echbili, A.; Hammami, M.; Attia, N.
643 Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from to extra virgin olive
644 oils. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, 23, 711-715.
- 645 [7] - Visioli, F.; Poli, A.; Galli, C. Antioxidant and Other Biological Activities of
646 Phenols from Olives and Olive Oil. *Med. Res. Rev.* **2002**, 22(1), 65-75.

- 647 [8] - Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Pereira, J. A. Cultivar effect on the
648 phenolic composition and antioxidant potencial of stoned table olives. *Food Chem.*
649 *Toxicol.* **2011**, *49*, 450-457.
- 650 [9] - Vinhas, A.; Ferreres, F.; Silva, B.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J.A;
651 Oliveira MBPP; Seabra, M. R.; Andrade, B.P. Phenolic profiles of portuguese olive
652 fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.*
653 **2005**, *89*, 561-568.
- 654 [10] - Aberoumond, A.; Deokule, S.S. Comparasion of phenolic compounds of some
655 edible plants of Iran and India. *PaK. J. Nutr.* **2008**, *7*(4), 582-585.
- 656 [11] - Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Coelho, A.V.; Vilas Boas, L. Phenolic
657 compounds and antioxidante activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci.*
658 *Techno. Int.* **2006**, *12*(5), 385-396.
- 659 [12] - Servili, M.; Montero, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil
660 quality. *Euro J of Lipid Sci Tech.* **2002**, *104*, 602-613.
- 661 [13] - Servili, M.; Selvaggini, R.; Espostos, S.; Taticchi, A.; Montedoro, Morozzi, G..
662 Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and
663 technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr*
664 *A.* **2004**, *1054*, 113-127.
- 665 [14] - De la Torre-Carbot, K.; Jaurequi, O.; Gimeno E.; Castellote, A.L.; Lamuela–
666 Raventós, R.M.; Lopez-Sabater, M.C. Characterization and quantification of phenolic
667 compounds in olive oils by solid-phase extaction, HPLC-DAD, and HPLC – MS/MS. *J*
668 *Agric Food Chem.* **2005**, *53* (11), 4331-40.
- 669 [15] - Kalua, C.; Allen, M.; Bedgood, D.; Bishop, A., Prenzler, P. Discrimination of
670 olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile
671 compounds. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*, 8054-8062.

- 672 [16] - Mailer, R; Beckingham, C. Chemistry and quality of olive oil. NSW Department
673 of Primary Industries. **2006**, 1-5.
- 674 [17] - Martins-Lopes P.; Gomes S.; Lima-Brito, J. Lopes J.; Guedes-Pinto H.
675 Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular
676 markers. *Sci. Hortic.* **2009**, 123 (1), 82-89.
- 677 [18] - Martins, A.; Santos, L.; Lopes, J.; Gouveia, J. Primeiros resultados da selecção
678 da variedade de oliveira Cobrançosa. *Rev. Ciências Agrárias*. **1998**, 21, 36–41.
- 679 [19] - Ozgen, M.; Reese, N.R.; Tilio Jr, A.Z.; Scheerens, J.C.; Miller, R.A. Modified
680 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure
681 Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing
682 Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J.*
683 *Agric. Food. Chem.* **2006**, 54, 1151-1157.
- 684 [20] - Barros, A.I.R.N.A.; Nunes, F.M.; Gonçalves, B.; Bennett, R.N.; Silva, A.P. Effect
685 of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts
686 (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.* **2011**, 128, 165-172.
- 687 [21] - Mateos, R.; Espartero, J. L.; Trujillo, M.; Ríos, J. J.; León-Camacho, M.,
688 Alcudia, F. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-
689 phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array
690 ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(5), 2185-2192.
- 691 [22] - ISO 8589:2007 – Sensory analysis – General guidance for the design of test
692 rooms.http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnum
693 ber=36385.
- 694 [23] - REGULAMENTO (CEE) N.º 2568/91 DA COMISSÃO de 11 de Julho de 1991
695 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos
696 métodos de análise relacionados (JO L 248 de 5.9.1991).

- 697 [24] - ISO 4121: 2003. Sensory analysis — Guidelines for the use of quantitative
698 response scales. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm.
- 699 [25] - Tovar, M.; Romero, M.; Girona, J.; Motilva, M. L-Phenylalanine ammonia-lyase
700 activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv
701 Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *J. Sci. Food. Agric.* **2002**, *82*,
702 892-898.
- 703 [26] - Hajimahmoodi, M.; Sadeghi, N.; Jannat, B.; Oveis, M.R.; Madani, S.; Kiayi, M.;
704 Akrami, M.R.; Ranjbar, A.M. Antioxidant Activity, Reducing Power and Total Phenolic
705 Content of Iranian Olive Cultivar. *J.Biol. Sci.* **2008**, *8* (4): 779-783.
- 706 [27] - Pires, R.D. Estudo da Valorização Comercial do Azeite de Trás-os-Montes e Alto
707 Douro. Instituto Politécnico de Bragança. **2005**, 32-35.
- 708 [28] - Gomes S.; Bacelar E.; Martins-Lopes P.; Carvalho T.; Guedes-Pinto H. Infection
709 Process of Olive Fruits by *Colletotrichum acutatum* and the Protective Role of the
710 Cuticle and Epidermis. *J. Agr. Sci.* **2012**, *4*(2), 104-114.
- 711 [29] - Bendini A. ; Cerretani L.; Carrasco-Pancorbo A.; Gómez-Caravaca A. M. ;
712 Segura-Carretero A. ; Fernández-Gutiérrez A.; Lercker G. Phenolic Molecules in Virgin
713 Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity
714 and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*. **2007**, *12*, 1679-
715 1719.
- 716 [30] - Obied H.K.; Bedgood Jr D.R.; Prenzler P.D.; Robards K. Chemical screening of
717 olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatograph. *Anal. Chim. Acta*. **2007**,
718 *603*, 176–189.
- 719 [31] - Morelló, J.R.; Romero, P.M.; Ramo, T.; Motilva, M.J. Evaluation of L.
720 phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea*
721 L.) from fruit setting period to harvesting time. *Food Sci.* **2005**, *168*, 65-72.



Capítulo III – Conclusões e perspetivas para trabalho futuro

3.1. Conclusões

Globalmente a atividade antioxidante, o teor em fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis dos Clones de azeitonas e respetivos azeites da cultivar Cobrançosa são diferentes. No entanto, e pela análise por HPLC, apresentam um perfil fenólico semelhante mas a percentagem de área calculada para cada composto identificado é diferente.

De um modo geral, o estado de maturação, não afeta a composição química dos Clones de azeitona estudados. No entanto, no caso dos azeites e considerando os parâmetros estudados e as características sensoriais que as amostras provocaram nos provadores, os Clones analisados comportaram-se de uma forma diferente, uma vez que em alguns Clones o estado de maturação afetou significativamente as modificações na composição fenólica, mas em outros Clones o estado de maturação não foi significativo.

Os resultados para a atividade antioxidante, teor em fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis nos azeites, de um modo geral diminuíram com o estado de maturação. Sensorialmente com o avançar da data de colheita, as amostras apresentavam um aroma e *flavor* a erva e um sabor amargo mais intenso.

Desta forma, os olivicultores podem colher mais cedo as azeitonas, pois parece não haver um efeito negativo, principalmente na qualidade e na própria aceitação dos azeites. Assim, uma colheita antecipada pode prevenir alguma infecções características das azeitonas, que estão propícias a aparecer com as primeiras chuvas e que afetam o rendimento de produção e a qualidade futura do azeite.

Os resultados obtidos neste trabalho e em estudos anteriores mostraram que a seleção dos Clones 80 e 85 é aconselhável para os olivicultores uma vez que estes dois Clones apresentam características interessantes como: alto rendimento de produção e alta atividade antioxidante, independentemente do estado de maturação.

3.2. Perspetivas para trabalho futuro

O nordeste transmontano é uma região onde por tradição os azeites têm excelentes características de qualidade. Como trabalho futuro seria interessante apostar no estudo da composição fenólica entre diferentes estados de maturação de outras variedades transmontanas como: Madural, Cordovil e Verdeal Transmontana, visto que, o perfil fenólico está diretamente relacionado com as propriedades organoléticas do azeite e que são fator decisivo na sua aceitação por parte do consumidor. Além disso a caracterização, quer no fruto, quer no azeite, em termos de composição fenólica é importante, pelas suas propriedades benéficas para a saúde.

Para o olivicultor do ponto de vista produtivo é mais importante valorizar essencialmente os Clones de azeitonas identificadas com alto rendimento de produção e que também apresentam alta atividade antioxidante. Em trabalhos futuros seria importante relacionar estes dois parâmetros em outros Clones, para que futuramente seja possível caracterizá-los e compará-los entre estados de maturação.