

**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**

**Estudo da resposta da azeitona de mesa, cultivar  
Negrinha de Freixo, ao longo do armazenamento em  
atmosfera com CO<sub>2</sub>**

Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Agronómica

**Cátia Filipa Martins Mendes**

**Orientadora: Professora Doutora Anabela Afonso Fernandes Silva**

**Co-orientador: Doutor Alfredo Aires**



Vila Real, 2014



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Estudo da resposta da azeitona de mesa, cultivar  
Negrinha de Freixo, ao longo do armazenamento em  
atmosfera com CO<sub>2</sub>**

Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Agronómica

**Cátia Filipa Martins Mendes**

**Orientadora: Professora Doutora Anabela Afonso Fernandes Silva**

**Co-orientador: Doutor Alfredo Aires**

**Composição do Júri:**

**Presidente do Júri: Professor Doutor Virgílio Alexandre Cardoso e Falco da Costa**

**1º Vogal: Professor Doutor Carlos Jorge de Oliveira Ribeiro**

**2º Vogal: Professora Doutora Anabela Afonso Fernandes da Silva**

**Vila Real, 2014**



Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronómica. As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.



## **Dedicatória e Agradecimentos**

Ao Senhor Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Prof. António Fontainhas Fernandes pelos meios concedidos para a realização deste trabalho.

Ao entregar esta Dissertação de Mestrado, é com enorme satisfação que agradeço a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar à orientadora Professora Doutora Anabela Silva, por ter-me orientado neste longo e extenuante período, por partilhar o seu conhecimento e por mostrar a sua total disponibilidade em concretizar este trabalho. Todo o apoio, simpatia e incentivo prestado.

Ao co-orientador Doutor Alfredo Aires de um modo particular pela orientação, disponibilidade e sobretudo pela ajuda prestada a concretizar a parte laboratorial, assim como pela transmissão dos seus conhecimentos científicos, opiniões e sugestões bem como a disponibilidade manifestada para tirar dúvidas que surgiam.

A toda a equipa do laboratório de fitoquímicos do departamento de Agronomia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em especial à D. Rosa pela simpatia, bom acolhimento, disponibilidade e principalmente por todo o auxílio técnico prestado no laboratório.

Remeto ainda os meus agradecimentos a todos os Docentes pelos conhecimentos transmitidos ao longo do Mestrado, que me proporcionaram a melhor formação.

A todos os meus amigos e colegas que me acompanharam, em especial a Teresa pelo companheirismo durante estes 2 anos de Mestrado.

À Lisandra, à Paula, à Liliana, à Armanda e à Francisca pela amizade partilhada ao longo da nossa vida académica, por dividirmos e somarmos as dificuldades na conquista de mais uma etapa, pela amizade, dedicação e alegria, foi com elas que me diverti. Obrigado por fazerem parte da minha vida!

E o maior agradecimento é dirigido à minha família. Aos meus pais, e a minha irmã pelo apoio incondicional, compreensão, incentivo, motivação e amor.

Aos meus avós, que onde estiverem, estão sempre a olhar por mim.

Ao Senhor Doutor Moreira e esposa, pelas suas sempre sábias palavras e motivação, mostrando-me sempre o caminho da fé.

Ao Senhor Engenheiro Francisco Pavão da Quinta Santo Amaro a simpatia e a disponibilidade por permitir a recolha das amostras.

Por último, mas não menos importante, ao meu namorado e melhor amigo, Davide, por todo o amor e carinho ao longo destes anos de namoro e principalmente pela motivação, paciência, palavra amiga e sempre na hora certa, todo o apoio demonstrado no desenrolar de mais esta etapa.

**OBRIGADA!**

## Resumo

As azeitonas de mesa têm uma grande tradição em Portugal. A Região de Trás-os-Montes e Alto Douro é a principal produtora de azeitona de mesa, nomeadamente da cultivar “Negrinha de Freixo” que integra a DOP “Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo”. Devido ao elevado amargor, as azeitonas não podem ser consumidas diretamente da oliveira, por isso é necessário ser submetidas a processos de desamerização (perda do amargor) para que fiquem “doces” de modo a possibilitar o seu consumo.

Neste sentido, com o presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do CO<sub>2</sub> na desamerização de azeitonas da cultivar Negrinha de Freixo, assim com nas propriedades físicas e químicas. As azeitonas foram colhidas num olival, em regime de sequeiro, localizado em Suções, próximo de Mirandela. Posteriormente as azeitonas foram submetidas a duas condições de armazenamento, ou seja, em atmosfera normal (tratamento controlo) e em atmosfera saturada CO<sub>2</sub>, durante um período de um mês. Durante este período avaliaram-se as diferenças nas propriedades sensoriais, organoléticas e físicas (amargor, textura, cor, cheiro e aparência) e químicas (pH, compostos fenólicos totais, compostos fenólicos individuais, orto-difenois, antocianinas,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e atividade antioxidante) utilizando métodos colorimétricos e de HPLC-DAD. De acordo com os resultados obtidos, ainda que preliminares, verificamos que de um modo geral as azeitonas conservadas sob atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> apresentaram diferenças significativas nas propriedades sensoriais e organoléticas, no perfil de compostos fenólicos, no teor em pigmentos e na atividade antioxidante, face às azeitonas mantidas sob atmosfera normal. O perfil fenólico permitiu a identificação de diferentes compostos fenólicos entre os quais se destacam o hidroxitirosol, tirosol, ácido caféico, rutina, verbascosido, luteolina-7-*O*-glucósido, luteolina-4-*O*-glucósido e a oleuropeína em quantidades superiores a todos os outros. Observou-se uma diminuição mais acentuada da Oleuropeína na atmosfera rica em CO<sub>2</sub> e também a maior perda de amargor. Com base nos resultados obtidos, concluímos que a atmosfera rica em CO<sub>2</sub> permite uma redução mais acentuada de oleuropeína, composto responsável pelo amargor característico das azeitonas não processadas, mas mantendo as características funcionais e organoléticas das azeitonas, neste último caso verificou-se que o armazenamento sob CO<sub>2</sub> contribuiu para o desenvolvimento de frutado a maçã. Este processo de desamerização apresenta potencialidades para ser uma alternativa aos métodos industriais que usam produtos químicos para a

perda de amargor, utilizam volumes de águas elevados e produzem efluentes, enquanto o armazenamento sob CO<sub>2</sub> não há este tipo de problema e por isso é mais ecológico

**Palavras-chaves:** Azeitona de mesa; atmosfera de CO<sub>2</sub>, amargor; oleuropeína; características organolépticas, composição química; atividade antioxidante.

## Abstract

Table olives are a great tradition in Portugal. The region of “Trás-os-Montes e Alto Douro” is the major producer of table olives, namely Cv. “Negrinha de Freixo” that integrates the DOP “Azeitonas Conservadas Negrinha de Freixo”. Outstanding the high bitterness of olives, this fruit can't be consumed directly from the olive tree, so it is necessary to submit them to loss of bittering process of loss of bitterness to make them "sweet" in order to enable its for consumption. In this sense, the present work aims to assess the effect of CO<sub>2</sub> in the submit them to loss of bittering process of olives (Cv. “Negrinha de Freixo”), and evaluate this effect in physical and chemical properties. Olives were harvested in an orchard in conditions of rainfed, located in “Mirandela” in the Northeast of Portugal. After the olives were subjected at two storage conditions, in normal atmosphere (control treatment) and saturated CO<sub>2</sub> atmosphere, during a period of one month and three weeks. During this period it was assessed differences in sensory properties, physical and organoleptic (bitterness, texture, color, smell) and chemical proprieties (pH,  $\beta$ -carotene, total phenolic compounds, individual phenolic compounds, ortho-diphenols, anthocyanins,  $\alpha$ -carotene, and antioxidant activity) using colorimetric methods and HPLC-DAD. According to the results we found that generally the olives stored under saturated atmosphere in CO<sub>2</sub> significant differences in sensory and organoleptic properties, phenolic profile, pigment content and antioxidant activity, as compared to olives kept under normal atmosphere. The phenolic profile allowed the identification of various phenolic compounds among, hydroxytyrosol, tyrosol, caffeic acid, rutin, verbascoside, luteolin-7-O-glucoside, luteolin-4-O-glucoside and oleuropein.

There was a greater reduction in the Oleuropein atmosphere rich in CO<sub>2</sub> and also a greater loss of bitterness. Based on these results, we conclude that the CO<sub>2</sub>-rich atmosphere allows a sharper reduction of oleuropein (compound responsible for the characteristic bitterness of the olives not processed), but preserve the functional and organoleptic characteristics of olives, in relation to the latter characteristic was verified that storage under CO<sub>2</sub> contributed to the developement of fruity apple. This process of submit them to loss of bittering process has potential to be an alternative to industrial methods that use chemicals to loss of bitterness, consuming high volumes of water and produces effluents; while the CO<sub>2</sub> storage it is more ecologic.

**Keywords:** Table olive; CO<sub>2</sub> atmosphere, bitter3ness; oleuropein; organoleptic properties, chemical composition; antioxidant activity.



# Índice Geral

	<b>Pág.</b>
Dedicatória e Agradecimentos.....	V
Resumo .....	VIII
Abstract.....	X
Índice de Quadros.....	XV
Índice de Figuras .....	XVII
<b>Capítulo 1 Introdução e Objectivos .....</b>	<b>1</b>
1.1-Introdução e Objectivos .....	2
<b>Capítulo 2 A Azeitona de Mesa .....</b>	<b>5</b>
2.1- Definição de azeitona de mesa .....	6
2.2 – Anatomia Geral do fruto da Oliveira.....	7
2.3- Classificação das azeitonas .....	8
2.4- Métodos de processamento e conservação da azeitona de mesa.....	12
2.4.1- Azeitonas de fermentação Natural .....	12
2.4.2- Azeitonas Verdes.....	15
2.4.3- Azeitonas Pretas Oxidadas .....	17
2.5-Valor nutricional da azeitona e atividade biológica.....	19
2.5.1- Composição química.....	19
2.5.2- Atividade biológica e atividade antioxidante .....	20
2.5.3- Atividade antimicrobiana .....	21
2.6- Fatores que influenciam a composição nutricional e o valor biológico da azeitona de mesa .....	22
2.7- Importância socio-económica da azeitona de mesa em Portugal.....	23
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>26</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>27</b>

3.1- Material vegetal.....	28
3.1.1- Local de colheita e amostragem .....	29
3.2- Preparação das amostras.....	32
3.3- Análise Sensorial.....	33
3.3- Análise dos parâmetros físicos.....	353
3.3.1- Cor.....	36
3.3.2 - Análises de textura .....	38
3.4- Análise dos parâmetros químicos.....	39
3.4.1- Extração do extrato orgânico da azeitona .....	40
3.4.2- Determinação de pH.....	44
3.4.3- Determinação do teor em compostos fenólicos totais e orto-difenóis .....	44
3.4.4- Antocianinas totais .....	45
3.4.5-Determinação e quantificação dos teores em $\alpha$ e $\beta$ -caroteno .....	46
3.4.6-Perfil em Fenólicos individuais.....	46
3.5- Atividade Antioxidante .....	47
3.5.1- Método do efeito bloqueador dos radicais de DPPH .....	47
3.5.2- Determinação do poder redutor ( $Fe^{3+}$ , em $Fe^{2+}$ ).....	48
3.5.3- Determinação do efeito de captura de radicais de $ABTS^+$ .....	49
3.7- Análise estatística.....	50
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>51</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>
4.1.- Análise sensorial .....	52
4.2.- Parâmetros físicos .....	56
4.2.1 - Cor.....	56
4.2.2 – Análises da textura.....	59
4.2.- Parâmetros químicos .....	60
4.2.1.-pH.....	60

4.2.2-Composição fenólica; orto-difenóis; antocianinas totais e teores de $\alpha$ e $\beta$ -caroteno .....	61
4.2.3-Composição fenólica individual.....	64
4.3- Atividade antioxidante .....	68
<b>Capítulo 5 Conclusão .....</b>	<b>71</b>
5.1- Conclusão .....	72
5.2- Considerações Futuras.....	74



## Índice de Quadros

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1-</b> Superfície de azeitona de mesa.....	<b>24</b>
<b>Quadro 2-</b> Análises efetuadas por data de amostragem .....	<b>33</b>
<b>Quadro 3-</b> Valores médios (n = 6) dos diferentes parâmetros físicos da análise da textura.....	<b>59</b>
<b>Quadro 4-</b> Teores médios da composição fenólica total, orto-difenois, antocianinas e carotenos nas azeitonas de mesa Negrinha do Freixo, submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação. ....	<b>63</b>
<b>Quadro 5-</b> Teores médios da composição em fenólicos individuais das azeitonas de mesa Negrinha do Freixo, submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação. ....	<b>67</b>
<b>Quadro 6-</b> Atividade antioxidante das azeitonas de mesa Negrinha do Freixo submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação. ....	<b>68</b>



## Índice de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> Corte transversal de uma azeitona e representação dos tecidos principais.....	8
<b>Figura 2-</b> Azeitonas no estado de maturação verde.....	9
<b>Figura 3-</b> Azeitonas no estado de maturação mista .....	9
<b>Figura 4-</b> Azeitonas no estado de maturação pretas .....	10
<b>Figura 5-</b> Fluxograma do processamento da fermentação natural das azeitonas. ....	14
<b>Figura 6-</b> Fluxograma do processamento das azeitonas verdes .....	17
<b>Figura 7-</b> Fluxograma do processamento das azeitonas pretas oxidadas. ....	18
<b>Figura 8-</b> Área geográfica do Concelho de Trás-os-Montes onde se recolheram as amostras de azeitona .....	25
<b>Figura 9-</b> Colheita manual das azeitonas na propriedade Casa Santo Amaro .....	29
<b>Figura 10-</b> Localização da propriedade onde se efetuou a colheita no Concelho de Mirandela (Suções).....	30
<b>Figura 11 A e B-</b> Propriedade e azeite DOP produzido na Casa Santo Amaro .....	31
<b>Figura 12-</b> Caixas perfuradas utilizadas para o transporte .....	31
<b>Figura 13-</b> Selecção e armazenamento das azeitonas em atmosferas diferentes.....	32
<b>Figura 14-</b> Esquema ilustrativo das análises físico-químicas realizadas.....	32
<b>Figura 15-</b> Amostras para análise sensorial.....	33
<b>Figura 16-</b> Azeitonas para fazer a análise da cor e textura.....	34
<b>Figura 17-</b> Prova de Análise Sensorial. ....	34
<b>Figura 18-</b> Provas Organoléticas realizadas .....	35
<b>Figura 19-</b> Colorímetro Konica Minolta CR-300 CHROMA METER.....	36
<b>Figura 20-</b> Processador de dados “DP-301” .....	37
<b>Figura 21</b> –TA.XT PLUS (Texture Analyser).....	38
<b>Figura 22-</b> Determinação da textura, pelo texturómetro (modelo TA.XT). ....	39
<b>Figura 23-</b> Selecção das azeitonas para as análises químicas. ....	40

<b>Figura 24-</b> Síntese do processo de preparação do extrato .....	40
<b>Figura 25-</b> Processo de obtenção do extrato (A-Descaroçamento das azeitonas; B-Secagem em estufa; C- pesagem das azeitonas secas) .....	41
<b>Figura 26-</b> Preparação do extrato (A- moinho para triturar as azeitonas; B- pó fino obtido após a trituração; C- sacos usados para colocar as azeitonas trituradas).....	42
<b>Figura 27-</b> Preparação do extrato: (A- Agitação no vortéx; B- Amostras na centrífuga) .....	43
<b>Figura 28-</b> Resultado precipitado e eliminação do sobrenadante.....	43
<b>Figura 29 -</b> Ensaio para quantificação da atividade antioxidante.....	48
<b>Figura 30-</b> Resultados obtidos da análise sensorial ao longo do armazenamento em períodos diferentes, os valores correspondem a mediana de cada um dos atributos avaliados pelo painel de provadores. A cor verde representa a atmosfera CO <sub>2</sub> e a cor vermelha a Atmosfera Normal .....	56
<b>Figura 31-</b> Resultados dos parâmetros para avaliação da cor. L- Luminosidade. Os resultados correspondem à média, n = 6. A cor vermelha representa a atmosfera CO <sub>2</sub> e o verde o atmosfera Normal .....	58
<b>Figura 32 -</b> Valor do pH nas diferentes amostragens elaboradas no presente estudo. ..	60
<b>Figura 33-</b> Exemplo do perfil cromatográfico a 280, 320 e 370 nm, das azeitonas Negrinha do Freixo submetidas conservadas em atmosfera saturada com CO <sub>2</sub> e atmosfera natural, no início do ensaio. ....	65

# **Capítulo 1**

## **Introdução e Objetivos**



## 1.1-Introdução e Objetivos

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore típica do clima mediterrânico, com maior predominância nos países da bacia do mediterrâneo. A principal utilização da azeitona é a extração de azeite e secundariamente o processamento para azeitona de mesa. Em Portugal, a cultura da oliveira tem uma importância económica elevada, estando espalhada um pouco por todo o território nacional, mas é sobretudo na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, Beiras e Alentejo que ocorre a sua maior concentração. De acordo com os dados mais atuais da FAO (FaoStat, 2014), Portugal produz cerca de 389900 toneladas de azeitonas, correspondendo a 345700 hectares e a uma produtividade de 1128 kg ha<sup>-1</sup>. Ainda segundo a mesma fonte, Portugal produziu no ano de 2012 cerca de 79600 toneladas de azeite. A azeitona de mesa é considerada um aperitivo indispensável na dieta mediterrânica com elevado valor biológico e nutricional e que acompanha alguns pratos típicos desta dieta.

Para o processamento da azeitona de mesa, são escolhidas fundamentalmente cultivares cujos frutos apresentam características físicas capazes de suportar as condições de processamento. Entre essas características destaca-se a forma, o volume, a firmeza, bem como a relação polpa/caroço, que as tornam adequadas ao processamento, de modo a remover o seu amargor e torná-las edíveis (COI/OT/NC nº1,2004). No passado, para a perda do amargor e conservação de azeitona era utilizada sobretudo a fermentação natural em salmoura em talhas de barro, tendo este procedimento muito pouco de tecnologia, mas muito de tradição e sabedoria popular. Atualmente, existem outros métodos de processamento da azeitona de mesa, desde fermentação natural, azeitonas verdes tipo espanhol, azeitonas pretas oxidadas, sendo no entanto o métodos de fermentação natural um dos mais importantes no que respeita ao valor nutricional e biológico deste alimento.

Com o presente trabalho pretende-se estudar o efeito do armazenamento da azeitona em atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>, em comparação com a atmosfera normal (isto é, sem CO<sub>2</sub>), sobre a evolução das características físicas, químicas e qualitativas da azeitona de mesa da cultivar Negrinha do Freixo. Pretendemos estudar a hipótese de um método eficiente, que mantenha as características da azeitona desta cultivar, mas que remova o amargor e que reduza o tempo de processamento. Para conseguir atingir este objetivo final pretendemos alcançar os seguintes objetivos:

- Estudar o efeito do CO<sub>2</sub> na diminuição do amargor, ou seja na diminuição do composto fenólico responsável por esta característica, a oleuropeína, no menor tempo possível com um método fácil e de baixo custo;
- Avaliar o efeito da conservação em atmosfera saturada de CO<sub>2</sub> nos parâmetros físico-químicos da azeitona, como a textura, cor, fenólicos totais, perfil fenólico, pigmentos e antocianinas e atividade antioxidante nas azeitonas;
- Analisar a aceitabilidade por parte do consumidor durante o período de armazenamento das azeitonas sujeitas ao tratamento com CO<sub>2</sub>

O presente trabalho apresenta-se estruturado em 5 Capítulos: o Capítulo 1, onde se encontram definidos os objetivos; no capítulo 2 é realizada uma revisão bibliográfica sucinta sobre a caracterização da azeitona de mesa e métodos de processamento e também dá-se enfoque à importância da azeitona de mesa em Portugal; no capítulo 3 são descritos o material e métodos utilizados no estudo; no capítulo 4 onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos, no último, o capítulo 5 inclui as conclusões e considerações futuras. Por último indicam-se as referências bibliográficas citadas ao longo do trabalho.

## **Capítulo 2**

### **A Azeitona de Mesa**



## 2.1- Definição de azeitona de mesa

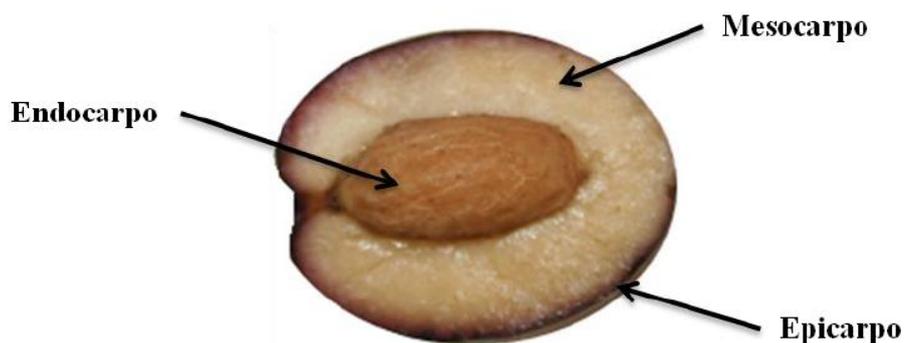
Com uma prática e tradição muito antiga a produção de azeitona para mesa é realizada por todo o mundo. “Entende-se por “Azeitona de mesa” o produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea* L. num estado de maturação conveniente, que são submetidas a tratamentos e operações que assegurem as suas características e uma boa conservação” (Norma Portuguesa NP-3034, 2012). “Na escolha da matéria-prima para processamento das azeitonas de mesa deve ter-se em conta alguns fatores que poderão comprometer a qualidade final do produto, entre os quais, a escolha da cultivar, o volume e forma do fruto, a proporção da polpa em relação ao caroço e as características da polpa, sobretudo o sabor, a firmeza e a facilidade de separação do caroço em relação à polpa” (Norma Portuguesa NP-3034, 2012). Ainda segundo esta norma, deve-se ter o cuidado de não usar frutos tratados com produtos químicos, como sejam os pesticidas ou outros produtos químicos/resíduos, que possam pôr em causa a saúde humana.

Ainda de acordo com o Codex Alimentarius (2010), “entende-se por “Azeitona de mesa” o produto preparado a partir de frutos sãos da variedade da espécie *Olea europaea* L., escolhidos consoante as suas características físico-químicas e que os tornam adequados para o processamento de azeitonas de mesa, processado para remover o amargor, conservados por meios que asseguram a sua estabilidade e evitam a sua deterioração em condições normais de armazenamento, com ou sem adição de conservantes e embalados, com ou sem meio líquido”.

## 2.2 – Anatomia Geral do fruto da Oliveira

A oliveira cultivada pertence à família das *Oleaceae* (do latim *Olivum*), é uma árvore dicotiledónea, que pertence ao género *Olea*. Este género inclui pelo menos 30 a 35 espécies, pertencentes à família *Oleaceae*, subfamília *Oleoideae* (Therios, 2009). Dentro desta família a espécie *Olea europaea* L. é a única que apresenta frutos comestíveis (COI, 1996; Barranco *et al.*, 2001; Therios, 2009).

Botanicamente o fruto da oliveira, a azeitona, é uma drupa, formada por uma única semente e três tecidos principais (Figura 1): epicarpo (pele), mesocarpo (polpa) e endocarpo (caroço) (Barranco *et al.*, 2001; Cabezas, 2011).



**Figura 1-** Corte transversal de uma azeitona e representação dos tecidos principais (Fonte: apontamentos da aula de Olivicultura)

Os três tecidos principais apresentam proporções distintas, sendo o de maior dimensão o mesocarpo, representando 84-90% do peso total (Galanakis, 2011; Ghanbair *et al.*, 2012), em seguida o tecido de maior dimensão é o endocarpo, estando dependente da cultivar (Hammami *et al.*, 2011). Para azeitona de mesa dá-se preferência a azeitonas com um mesocarpo elevado (peso unitário da azeitona superior a 4g) e a relação mesocarpo/endocarpo tem de ser desproporcional, ou seja, mesocarpo com maior peso em relação ao endocarpo, a forma e a textura são aspetos relevantes das azeitonas de mesa (Ghanbari *et al.*, 2012).

### **2.3- Classificação das azeitonas**

Segundo o Concelho Oleícola Internacional COI (2004) o Codex Alimentarius (2010) e a Norma Portuguesa NP – 3034 (2012), as azeitonas de mesa, podem ser categorizadas em três tipos de acordo com o estado de maturação:

**i) Azeitonas Verdes:** os frutos são colhidos durante o período de amadurecimento (início de Outubro), antes de ter uma cor rosada, mas os frutos já atingiram o calibre ideal. A cor do fruto pode variar de verde a amarelo-palha (Figura 2).



**Figura 2-** Azeitonas no estado de maturação verde. (Fonte: <http://eb1aldeiajoanes-fotos.blogspot.pt/2012/11/azeitonas-poema-numerico.html>)

**ii) Azeitonas mistas:** os frutos são colhidos antes de atingirem a maturação completa, no Outono, com uma cor variável do epicarpo ou (exocarpo), entre tons rosados e acastanhados (Figura 3), mas com o mesocarpo totalmente branco.



**Figura 3-** Azeitonas no estado de maturação mista (Fonte: <http://guiaalimentacaosaudavel.blogspot.pt/2012/10/os-beneficios-das-azeitonas-e-do-azeite.html>):

**iii) Azeitonas pretas:** frutos colhidos em plena maturação ou ligeiramente antes. A cor dos frutos pode variar de negro-avermelhado a castanho-escuro passando por tons violáceos, dependendo da zona e da época da colheita (Figura 4).



**Figura 4-** Azeitona no estado de maturação pretas (Fonte: <http://jcoimbra.files.wordpress.com/2007/11/azeitona.jpg>)

As azeitonas de mesa além de serem classificadas pelo estado de maturação e de acordo com a Norma Portuguesa NP – 3034 (2012) e o COI (2004), também se classificam pelo processamento tecnológico e assim temos:

**i) Azeitonas verdes, mistas ou pretas tratadas:** são submetidas a um tratamento alcalino, embaladas em salmoura, onde ocorre fermentação parcial ou completa. A sua conservação pode ser assegurada por adição de agentes acidificantes, por esterilização ou pasteurização.

**ii) Azeitonas verdes, mistas ou pretas ao natural:** não são submetidas a qualquer tratamento prévio, são colocadas diretamente em salmoura, onde ocorre uma fermentação total ou parcial, conservadas por fermentação natural.

**iv) Azeitonas verdes, mistas ou pretas desidratadas ou enrugadas:** submetidas ou não a um ligeiro tratamento alcalino. Conservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas com sal seco e/ou por aquecimento ou qualquer outra aplicação de outro processo tecnológico.

**v) Azeitonas verdes ou mistas escurecidas por oxidação:** são obtidas de frutos que não atingiram a maturação completa, ocorrendo ou não a fermentação. A azeitona, in-

dependentemente da cor, é escurecida por oxidação com ou **sem** meio alcalino. Devem ser acondicionadas em salmoura e preservadas por esterilização. A sua cor preta é homogénea.

Segundo o Codex Alimentarius (2010), existe ainda uma outra classificação no que refere ao processo tecnológico:

**i) Especialidades:** são azeitonas de mesa preparadas segundo outros métodos que não os anteriores. Pode-se considerar as “alcaparras” como exemplo, típicas em Trás-os-Montes.

Existe ainda de acordo com a NP – 3034 (2012) e as normas do Codex Alimentarius (2010), um terceiro fator a considerar na classificação das azeitonas de mesa que é a forma de apresentação e assim estas podem ser classificadas como:

**a) Azeitonas Inteiras:** com forma natural, não descaroçadas, com ou sem pedúnculos;

- **Retalhadas:** azeitonas inteiras onde a polpa é golpeada sem quebrar o caroço;
- **Divididas:** azeitonas inteiras que sofrem um corte longitudinal da pele e da parte da polpa.

**b) Azeitonas descaroçadas:** com forma natural, às quais foi retirado o caroço;

- **Divididas:** azeitonas cortadas em duas partes aproximadamente iguais perpendicularmente ao maior eixo do fruto, podendo ser recheadas;
- **Em quartos:** azeitonas divididas em quatro partes aproximadamente iguais;
- **Em fatias:** azeitonas divididas em mais de quatro partes aproximadamente iguais;
- **Picadas:** azeitonas desprovidas de forma ou de fragmentos de fatias;
- **Quebradas:** azeitonas partidas enquanto são descaroçadas, podem ser recheadas.

**c) Azeitonas recheadas:** azeitonas descaroçadas e recheadas com diversos produtos, tais como: pimento, cebola, avelã, amêndoa, aipo, anchôva, casca de laranja, casca de limão, azeitonas ou com pasta de azeitonas;

- **Em metades:** frutos recheados e cortados em duas partes aproximadamente iguais;
- **Em rodela:** frutos recheados e cortados em fatias sensivelmente com a mesma espessura.

**d) Pasta de azeitonas:** é constituída por polpa de azeitona triturada finamente, podendo ser adicionados outros ingredientes.

## 2.4- Métodos de processamento e conservação da azeitona de mesa

As azeitonas ao contrário dos outros frutos necessitam de sofrer alterações físico-químicas, com o objetivo de se tornarem paletáveis, preservando as características exclusivas do fruto e possibilitando a conservação por um maior período de tempo (Bianchi, 2003).

As alterações físico-químicas são indispensáveis para extrair o amargor altamente excessivo, da azeitona, que se deve em grande parte à presença do composto fenólico oleuropeína (Gómez *et al.*, 2006; Ben Othman *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010).

Devidas as modificações que as azeitonas sofrem pelo processo de fermentação vão proporcionar modificações no aroma, no sabor e na qualidade do produto final estas modificações só são possíveis devido à atividade das bactérias lácticas e leveduras presentes no decorrer da fermentação (Bautista - Gallego *et al.*, 2011).

De acordo com os seguintes autores (Aponte *et al.*, 2010; Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012; Malheiro *et al.*, 2012) consideram entre diversos métodos de processamento de azeitonas de mesa, temos três com maior relevância a nível internacional: **azeitonas de fermentação natural** (estilo grego); **azeitonas verdes** (estilo sevilhano ou espanhol); e as **azeitonas pretas oxidadas** (estilo californiano ou americano)

### 2.4.1- Azeitonas de fermentação Natural

Na fermentação natural e enquanto a azeitona mantém uma textura firme e um tamanho normal independentemente da sua condição de maturação as azeitonas são colhidas (Panagou *et al.*, 2011; Charoenprasert & Mitchell, 2012). Os frutos podem

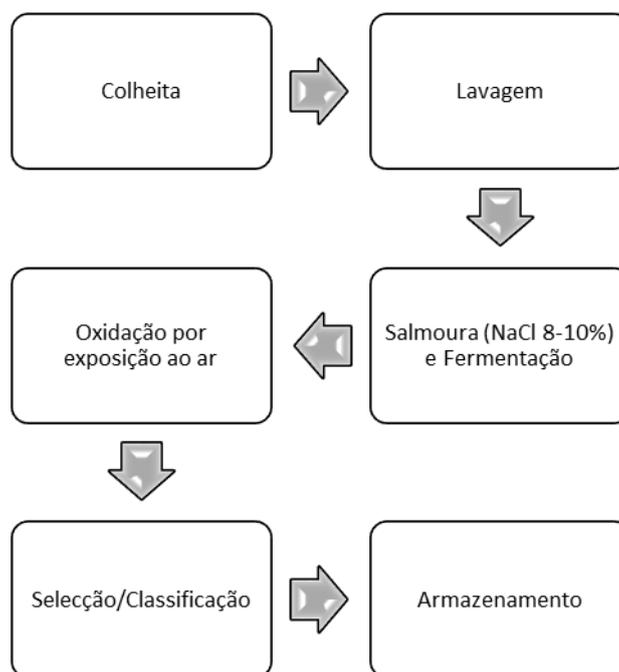
apresentar colorações que variem desde verde a vermelho-escuro dependendo da região de produção e da época de colheita e serem exatamente ideais para a preparação deste tipo de azeitonas (Fernández *et al.*, 1997).

Posteriormente à colheita, as azeitonas são levadas para uma unidade industrial, o mais rapidamente possível para minimizar perdas na qualidade das azeitonas, são selecionadas e removidos os frutos com defeito, calibradas e posteriormente lavadas com água para eliminar a sujidade superficial (Fernández *et al.*, 1997; Nychas *et al.*, 2002). Após estes procedimentos, são diretamente colocadas em salmoura com uma concentração de sal (NaCl) a oscilar entre 8% e 10% (Tassou *et al.*, 2002; Rejano *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006). Os autores referem Hurtado *et al.* (2008); Aponte *et al.* (2010), que assim começa uma fermentação natural e espontânea, (Figura 5) que se pode dar em condições de anaerobiose ou aerobiose e pela qual estimulada, na sua maioria, por uma complexa microflora de leveduras, cuja atividade é despertada pela elevada quantidade de sal usado. É de referenciar que também interagem bactérias gram-negativas e bactérias ácido-lácticas (Panagou *et al.*, 2011), ficando estas parcialmente inibidas devido à presença de compostos fenólicos (Bautista-Gallego *et al.*, 2011). A hidrólise da oleuropeína durante o processo de fermentação é atribuída ao pH ácido e à atividade  $\beta$ -glucosidase gerada pelas leveduras (Psani & Kotzekidou, 2006). À demorada difusão dos compostos solúveis através da pele da azeitona para o exterior provoca uma lenta fermentação destas azeitonas, bem como à lenta solubilização da própria oleuropeína na salmoura, encontrando-se um equilíbrio entre 8 a 12 meses (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008), quando se esgotam todos os substratos fermentáveis, na sua maioria açúcares, (Cardoso *et al.*, 2010).

A flora microbiana disponível limita o processo de fermentação, que por sua vez depende dos substratos fermentáveis, do conteúdo de sal, do pH e da temperatura, bem como das condições de anaerobiose ou aerobiose utilizadas e dos compostos antimicrobianos presentes, como os compostos fenólicos. Sendo assim e atendendo a aperfeiçoar a fermentação e produzir produtos de elevada qualidade é indispensável controlar estes parâmetros que afetam o metabolismo da microflora existente (Nychas *et al.*, 2002, Panagou *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012). Depois de concluído o processo de fermentação e de modo a melhorar a cor, as azeitonas são oxidadas por exposição ao ar, não devendo exceder este passo mais de 48 horas, para não se dar o enrugamento das

mesmas (Gómez *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010). No que concerne às características físicas e sensoriais, a fração fenólica das azeitonas é de extrema relevância (Marsilio *et al.*, 2001), demonstrando ainda propriedades antioxidantes (Othman *et al.*, 2009) e antimicrobiana (Sousa *et al.*, 2006), sendo fundamental mencionar que os compostos fenólicos principais nas azeitonas pretas antes de sofrerem a fermentação natural são a oleuropeína, hidroxitirosol, hidroxitirosol-4- $\beta$ , glucósido, tirosol, salidroside e verbascosido, decorridos 12 meses de fermentação os principais compostos fenólicos passam a ser o hidroxitirosol, seguido por hidroxitirosol acetato, tirosol acetato e tirosol (Romero *et al.*, 2004).

Segundo os autores Fernández *et al.* (1997) depois de terminar o processo de oxidação, as azeitonas podem ser embaladas numa nova salmoura adequada e comercializadas imediatamente necessitando de ser sempre garantida a sua conservação mediante processos de pasteurização ou esterilização do produto (Cabezas, 2011), ou adição de substâncias conservantes como o sorbato de potássio ou sorbato de sódio (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006).



**Figura 5-** Fluxograma do processamento da Fermentação Natural das Azeitonas.

Os autores Barranco *et al.* (2001); Romero *et al.* (2004); Kanavouras *et al.* (2005); Cabezas, (2011); Panagou *et al.* (2011) evidenciam que as azeitonas produzidas seguindo o método de fermentação natural, com ou sem adição de substâncias aromáticas têm um gosto a fruto mais realçado e preservam um brando amargor, devido basicamente à presença de polifenóis residuais, ocasionando um produto de alto valor nutritivo, com uma textura e cor característicos

#### **2.4.2- Azeitonas Verdes**

Segundo alguns autores (Fernández *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2004) referem que na preparação das Azeitonas Verdes (Estilo Espanhol ou Sevilhano), o primeiro passo a efetuar para o processamento é a colheita das azeitonas com uma coloração verde ou verde-palha. Sucessivamente, são transportadas para a unidade industrial onde são escolhidas, classificadas por calibres, e submetidas a um tratamento alcalino com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) com o objetivo de remover quimicamente o seu amargor (Gómez *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012) e a elevar a permeabilidade da parede celular (Arroyo-López *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Parinos *et al.* (2007) menciona que no decorrer deste processo há a hidrólise da oleuropeína, que é lábil em condições alcalinas. Este tratamento deve persistir até que o NaOH alcance cerca de dois terços da polpa (Parinos *et al.*, 2007; Rejano *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012). A concentração de NaOH adequada está dependente de diversas condições como a temperatura, a cultivar, o grau de maturação dos frutos (Fernández *et al.*, 1997) e a qualidade da água da salmoura (Rejano *et al.*, 2010).

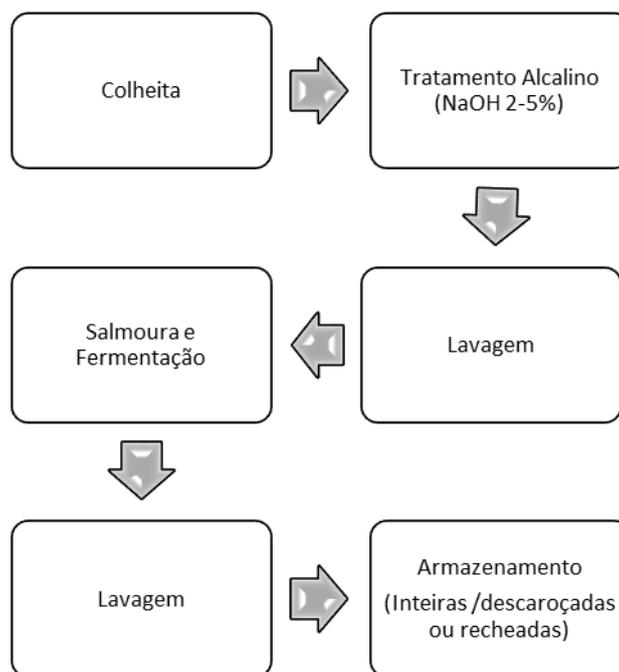
De acordo com os alguns estudos (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Castro & Brenes, 2001) aludem que depois do tratamento alcalino, os frutos são sujeitos a determinados ciclos de lavagem com água por períodos de tempo variáveis, com o objetivo de diminuir drasticamente o excesso de NaOH. Prepara-se uma salmoura, onde vão ser colocados os frutos, com concentração variável entre 6% e 8% onde ocorre uma fermentação láctica natural, principalmente por bactérias lácticas (Montaño *et al.*, 2003; Panagou *et al.*, 2006; Aponte *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012). A durabilidade da fermentação segundo (Fernández *et al.*, 1997) depende das características do tratamento alcalino prévio, da cultivar, da temperatura, e os autores Brenes *et al.* (1995) acrescentam ainda

que depende da população microbiana presente e da presença de compostos inibidores, como os compostos fenólicos.

Consegue-se identificar quatro fases distintas ao longo da fermentação, caracterizadas pelo crescimento de diferentes populações microbianas (Montaño *et al.*, 2003).

Na primeira fase as principais espécies presentes são as bactérias gram-negativas, na sua maioria pertencentes à família Enterobacteriaceae. A segunda fase começa regularmente quando o pH do meio baixa para 6 e dura cerca de duas semanas, havendo um crescimento progressivo de bactérias ácido-láctico e leveduras e uma diminuição progressiva de bactérias gram-negativas. Na terceira fase, surge um abundante desenvolvimento de lactobacillus, especialmente *Lactobacillus plantarum* tornando-se a espécie preponderante na fermentação (Fernández *et al.*, 1997; Panagou *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010).

O desenvolvimento desta bactéria láctica incita o aumento da acidez do meio, pelo aumento da produção de ácido láctico, obtendo-se assim valores de pH muito reduzidos (Panagou *et al.*, 2006). Já a quarta e última fase inicia quando a maioria dos substratos fermentáveis finda, advindo uma diminuição do ácido láctico e um ligeiro aumento do pH, sendo o principal género presente *Propionibacterium* (Fernández *et al.*, 1997; Barranco *et al.*, 2001). O estudo realizado por Hurtado *et al.* (2008) declara que no entanto, a população microbiana presente na salmoura é também influenciada pelo microbiota natural existente nas azeitonas, por fatores intrínsecos do fruto como o pH, atividade da água ou ainda pelos níveis de compostos com atividade antimicrobiana, como a oleuropeína, e por outros fatores extrínsecos ao fruto como a temperatura, a disponibilidade de oxigénio e a concentração de sal na salmoura. Quando ocorre o esgotamento dos substratos fermentáveis e estiver concluída a fermentação, as azeitonas são novamente escolhidas e classificadas por calibre e são armazenadas inteiras, descaroadas ou recheadas (Gómez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008). De forma a regularizar e garantir a conservação do produto final (Figura 6), as azeitonas embaladas podem ainda ser sujeitas a um processo de pasteurização (15 minutos a 62,4°C) (Fernández *et al.*, 1997).



**Figura 6-** Fluxograma do processamento das azeitonas verdes (Estilo Espanhol)

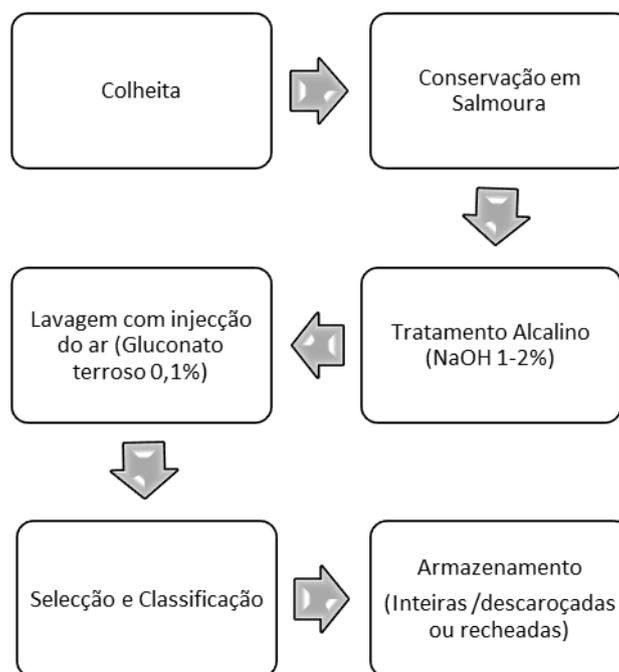
### 2.4.3- Azeitonas Pretas Oxidadas

Descrevendo o processamento das azeitonas pretas oxidadas (Figura 7), também denominadas por Estilo Californiano ou Americano, as azeitonas usadas são colhidas antes de alcançar a plena maturação, quando a sua cor está a começar a modificar (Rejano *et al.*, 2010). Após a colheita e antes de se iniciar o processamento as azeitonas podem ser armazenadas durante um período de 2 a 6 meses, tendo em atenção as necessidades de produção sob condições anaeróbias numa salmoura com uma concentração de NaCl de 5-10% (Bianchi, 2003; Mafra *et al.* 2003), ou podem ser submetidas diretamente a processos de oxidação sem qualquer tipo de conservação (Gómez *et al.*, 2006; Ghanbari *et al.*, 2012). Os autores Marsilio *et al.* (2001) mencionam que as azeitonas são então sujeitas a tratamentos consecutivos com soluções de NaOH, por períodos de tempo variáveis, de forma que aconteça uma penetração progressiva desde a pele à polpa e, por fim, ao caroço. No intervalo de cada tratamento, os frutos são arejados através das passagens de ar pelo líquido, de modo a que estas fiquem oxidadas uniformemente (Mafra *et al.*, 2003; Arroyo-López *et al.*, 2010). Dependendo do estado de maturação dos fru-

tos, da cultivar, da temperatura do tratamento e da penetração desejada, a concentração das soluções de NaOH também varia (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010).

É indispensável evidenciar o valor dos compostos fenólicos ao longo deste processo, pois estes representam o substrato para as enzimas oxidativas fundamentais para a formação da cor negra própria desta azeitona (Marsilio *et al.*, 2001).

Posteriormente as lavagens com água para retirar o excesso de NaOH e baixar o pH da polpa para mais ou menos 8 (Marsilio *et al.*, 2001; Bianchi, 2003), são acrescentados sais de ferro, como o gluconato ferroso ou lactato ferroso, para preservar a cor preta dos frutos (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008). Por último, os frutos são selecionados e acondicionados em salmoura, em diversos recipientes, incluindo ainda uma ligeira quantidade de um dos sais de ferro indicados, de forma a precaver a deterioração da cor negra. Consegue-se garantir a preservação do produto final, submetendo-o a esterilização pelo calor (Ghanbari *et al.*, 2012). Para tornam um produto acidificado faz-se a adição de ácido, como o ácido láctico ou glucónico, atingindo o (pH <4,6), ou a pasteurização (Gómez *et al.*, 2006). As azeitonas são então embaladas em diferentes formatos de apresentação como inteiras, descaroçadas, fatiadas ou em pasta de azeitona (Gómez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008).



**Figura 7-** Fluxograma do processamento das azeitonas pretas oxidadas.

## **2.5-Valor nutricional da azeitona e atividade biológica**

### **2.5.1- Composição química**

A azeitona de mesa é um componente integrante relevante na dieta Mediterrânea (Anniva & Tsimidou, 2009).

Em relação à composição química, os frutos da oliveira são constituídos por 60-75% de humidade (Cardoso *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 1997; Sousa *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012; Nogueira, 2012; Romeo *et al.*, 2012), 12 a 20% de gordura (Malheiro *et al.*, 2012; Nogueira, 2012), 1 a 4% teor em cinzas (Romeo *et al.*, 2012), 2 a 3,5% de proteínas (Conde *et al.*, 2008; Nogueira, 2012) e 3 a 5% de hidratos de carbono (Malheiro *et al.*, 2012; Nogueira, 2012). O seu valor energético varia entre 150 a 205 Kcal/100g de azeitona (Sousa *et al.*, 2011; Nogueira, 2012; Malheiro *et al.*, 2012).

Segundo alguns estudos (Fernández *et al.*, 1997; Conde *et al.*, 2008) em grande parte a polpa da azeitona é constituída por água, de 70 a 75% e uma fração lipídica que varia entre 14 e 15 % nas azeitonas verdes e cerca de 30% do peso da polpa nas azeitonas pretas.

Em relação ao teor de açúcar apresenta um reduzido teor (2-5%) e proteína (3%) sendo o excedente composto por fibras e cinzas (Conde *et al.*, 2008).

Em termos da fração lipídica das azeitonas de mesa exhibe uma composição idêntica à do azeite, prevalecendo os ácidos gordos monoinsaturados, com o ácido oleico como o composto principal, e um teor em ácidos gordos saturados que não excedem 15% do total dos lípidos (Conde *et al.*, 2008; Sakouhi *et al.*, 2008). Na generalidade os ácidos gordos encontram-se na forma de triglicéridos e a quantidade em ácidos gordos livres é, de um modo genérico baixo (Bianchi, 2003).

Na polpa o principal açúcar livre presente é a glucose (1 a 3% do peso da polpa) em segundo a frutose (0,1 a 1,1 %) e com reduzidas concentrações de xilose, sacarose e manitol (Nout & Rombouts, 2000).

No que diz respeito aos ácidos orgânicos, os ácidos oxálico, succínico, málico e cítrico existem em proporções entre 1,2 a 2,1% do peso da polpa em matéria-seca (Bianchi, 2003).

## 2.5.2- Atividade biológica e atividade antioxidante

Devido essencialmente ao seu elevado teor em compostos fenólicos as azeitonas mostram marcantes propriedades biológicas tais como (Ryan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006; Savarese *et al.*, 2007) antimicrobianas (Sousa *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2007) e propriedades antioxidantes (Owen *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006; Ben Othman *et al.*, 2009; Malheiro *et al.*, 2011).

O estudo realizado por Satoh *et al.* (2005) expõe que no decorrer do metabolismo celular são originadas espécies reativas de oxigênio que, em contacto com concentrações elevadas, tem uma ação tóxica no organismo humano. As células detêm defesas intracelulares, particularmente enzimas (superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase) para as defender contra níveis desmesurados de radicais livres. Uma proteção complementar pode ser provida com a adição exógena de compostos tais como vitamina (A e E), minerais (selênio, zinco) ou proteínas (transferrina, albumina) (Ostrovidov *et al.*, 2000), ácidos lipóicos, e flavonóides (ex: apigemina e luteolina) entre outros (Valko *et al.*, 2007).

Desta forma, nomeadamente aqueles compostos conseguidos através da dieta alimentar que promovem processos de destoxificação e aprisionamento e supressão de compostos radicalares bem como processos anti-inflamatórios, atribuir-se uma elevada importância como prováveis agentes protetores que auxiliem o corpo humano na redução dos danos oxidativos. Como se verifica uma preciosa composição, da azeitona, neste tipo de compostos, tais como os carotenóides, tocoferóis, flavonóides e compostos fenólicos (Savarese *et al.*, 2007), apresenta importantes propriedades antioxidantes (Ben Othman *et al.*, 2009).

Existe uma imensa diversidade de composto fenólicos nas azeitonas, com um papel primordial nas propriedades químicas e organolépticas e nutricionais das azeitonas de mesa e do azeite virgem (Rodríguez *et al.*, 2009). Ácidos fenólicos, flavonóides e sacoiroides são as classes principais de compostos fenólicos na azeitona de mesa (Ryan & Roberts, 1998; Brenes *et al.*, 1999; Soler-Rivas *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2003; Vinha *et al.*, 2005).

Os polifenóis encontrados nas azeitonas não processadas são essencialmente o secoiridoide oleuropeína, o hidroxitirosol e tirosol (Uccella, 2001; Bianchi, 2003; Blekas *et al.*, 2002; Conde *et al.*, 2008).

### 2.5.3- Atividade antimicrobiana

Múltiplos estudos têm revelado que para além da atividade antioxidante, há a existência de atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos presentes nas azeitonas (Malheiro *et al.*, 2012) vindo estes ser uma opção natural ao uso indiscriminado de antibióticos e conservantes químicos (Oliveira *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos presentes nas azeitonas de mesa podem ser considerados bons candidatos como agentes antimicrobianos, para utilizar contra bactérias responsáveis para infeções gastrointestinais e infeções respiratórias no ser humano (Pereira *et al.*, 2006). Estes compostos podem ser empregados também como aditivos alimentares alternativos em detrimento de compostos químicos, por apresentarem atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos.

Em conformidade com Nouts & Rombouts (2000), os compostos fenólicos realizam um papel importante na fermentação devido às suas propriedades antimicrobianas, particularmente contra bactérias lácticas e na evolução da cor do fruto durante a maturação do processo de escurecimento das azeitonas pretas oxidadas.

Dos compostos fenólicos presentes na azeitona de mesa que têm apresentado propriedades antimicrobianas, realça-se o hidroxitirosol (Medina *et al.*, 2007) e a oleuropeína (Bisignano *et al.*, 1999; Furneri *et al.*, 2002). Os seguintes autores Bisignano *et al.* (1999) averiguaram que o hidroxitirosol e a oleuropeína são capazes de impedir o crescimento das bactérias *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catanhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella aureus*. No estudo de Furneri *et al.* (2002) foi apurado que a oleuropeína impedia o crescimento de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma piru*. Em outros estudos podemos ainda confirmar que estes compostos podem também impedir ou retardar a taxa de crescimento de algumas bactérias patogénicas dos tratos gastrointestinal e sistema respiratório, nomeadamente a *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginoliticus* (Briante *et al.*, 2004).

Em Portugal, atestou-se que aproveitando extratos produzidos a partir de azeitona de mesa, que estes eram capazes de impossibilitar o crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Pereira *et al.*, 2006).

## **2.6- Fatores que influenciam a composição nutricional e o valor biológico da azeitona de mesa**

Quando analisamos a composição nutricional e o valor biológico de qualquer produto agrícola, verificamos que estes são sempre influenciados por um grande número de fatores. O mesmo sucede para a azeitona de mesa. Fatores como condições climáticas, cultivares usadas e o estado de maturação no instante da colheita, restringem a composição final da azeitona e cooperam para a qualidade do produto final (Conde *et al.*, 2008).

Relacionado a estes fatores conseguimos ainda incluir o processamento da azeitona de mesa, principalmente no que diz consideração ao tratamento alcalino e à fermentação, os quais incitam alterações físico-químicas do fruto. Os autores Unal & Nergiz (2003) referem que o processamento efetuado à azeitona para a tornar palatável, bem como a salmoura usada fazem com que o teor em humidade, cinzas e NaCl aumente. Já as consecutivas lavagens dos frutos e imersões tanto em soluções alcalinas como salinas de modo a possibilitar uma correta eliminação do amargor e fermentação dos frutos, respetivamente, faz com que haja um aumento do teor de água nas azeitonas. No que respeita ao aumento considerável em cinzas, estas revertem da penetração de NaCl (presente na água de salmoura) na polpa dos frutos. Na razão inversa, logo nas primeiras semanas de armazenamento os açúcares reductores desaparecem por absoluto até ao final da fermentação (Unal & Nergiz, 2003), porque acontece a difusão dos açúcares (compostos fermentáveis) ao longo da fermentação através da película do fruto para a solução (Gómez *et al.*, 2006). Os açúcares existentes, na salmoura, são aproveitados pela flora presente como fonte de energia para o seu normal crescimento e consequente fermentação (Kailis & Harris, 2007). De acordo com Unal & Nergiz (2003) em determinados tratamentos também se confirma uma ligeira redução no teor de proteínas, de fibras e do valor calórico. No que se refere aos açúcares, estes desaparecem praticamente por absoluto para serem utilizados como fonte de energia para leveduras e bactérias. Os mesmos autores (Unal & Nergiz, 2003) também citam ainda que juntamente a um aumento percentual do teor em água, a densidade energética do produto processado reduz tenuemente em relação à matéria-prima. Já os estudos de Fernández *et al.* (1997) e Rombouts (2000) referenciam que, os açúcares solúveis decrescem ao longo do processo de maturação do fruto, e compõem a principal fonte de energia e carbono para os microrganismos presentes na fermentação das azeitonas de mesa. Com o evoluir da ma-

turação, existe um aumento da concentração de ácidos orgânicos, estabilizando com o culminar da maturação (Bianchi, 2003).

O processamento influencia na composição nutricional, mas também influencia as propriedades biológicas das azeitonas, entre as quais a capacidade antioxidante. Diversos estudos têm revelado que o processamento interfere na capacidade antioxidante das azeitonas por influenciar nos teores em compostos bioativos designadamente os compostos fenólicos. Segundo Pereira *et al.* (2006) o processamento influencia na atividade antioxidante pois repararam que azeitonas sujeitas a um processo de fermentação natural exibem maior conteúdo em compostos fenólicos e maior atividade antioxidante do que as azeitonas oxidadas (estilo californiano).

Além do mais, já Soler-Rivas (2000) a este propósito, evidenciava que o potencial antioxidante da azeitona de mesa pode ser afetado não só pela cultivar mas também pelo processamento tecnológico, derivado ao longo do processo ocorre uma perda e/ou mudança do conteúdo em compostos fenólicos. Durante a maturação a oleuropeína vai diminuindo (Ryan & Robards, 1998) ao contrário verifica-se um aumento do teor em hidroxitirosol, que se evidencia e prevalece como o composto fenólico maioritário nas azeitonas maduras (Romero *et al.*, 2002). Embora os compostos fenólicos estejam presentes em praticamente todas as cultivares, cada cultivar tem um perfil fenólico específico (Esti *et al.*, 1998), mas de uma maneira global em todas as cultivares, ao longo do processamento sucedem transformações químicas que levam à alteração das suas concentrações.

## **2.7- Importância socio-económica da azeitona de mesa em Portugal**

Devido a ser uma cultura que abrange uma vasta área em Portugal a azeitona de mesa tem um papel socio-económico muito importante. Em Portugal continental, Trás-os-Montes e Alto Douro é a principal região produtora de azeitona de mesa com 2740 ha, nomeadamente a região de Freixo de Espada à Cinta a mais importante. A segunda região produtora de azeitona de mesa é o Alentejo, com uma área de 843 hectares, seguidamente a região da Beira Interior com 244 hectares (INE-RGA, 2009).

Observando os valores da comercialização de azeitona de mesa em Portugal, em 2012 registou-se uma importação deste produto de 7470 toneladas e uma exportação de

772 toneladas, em 2012, correspondendo a um valor transacionado de 3902000 euros e 166 00 euros, respetivamente (Estatística Agrícola, 2012).

Para a preservação da produção das azeitonas de mesa em Portugal foram criadas e legisladas com normas específicas e de acordo com a cultura as DOP's.

A DOP “Azeitona de Conserva de Elvas e Campo Maior”, é processada com azeitonas das cultivares Azeiteira, Carrasqueira, Redondil e Conserva de Elvas, sendo a sua área de produção restrita aos Concelhos de Elvas e Campo Maior (Regulamento CEE nº 2081/92).

**Quadro 1-** Superfície de azeitona de mesa (INE- RGA, 2009)

<b>Regiões</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>(%)</b>
Portugal	4090	100
Continente	4090	100
Entre Douro e Minho	2	0
Trás-os-Montes	2740	67
Beira Litoral	11	0
Beira Interior	244	6
Ribatejo	61	1
Alentejo	843	21
Algarve	189	5
Açores	0	0
Madeira	0	0

Já a DOP “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”, preservada pelo regulamento (CE) nº1107/96, é processada a partir da cultivar Negrinha de Freixo. Em concordância com o despacho 47/94, o qual também identifica a Denominação de Origem, a área geográfica de produção está delimitada aos Concelhos de Vila Nova de Foz Côa, Freixo de Espada à Cinta, Torre de Moncorvo, Alfândega da Fé, Vila Flor, Mirandela e Macedo de Cavaleiro (Figura 8).

O órgão responsável pela gestão da DOP “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” é a Adega Cooperativa de Freixo de Espada à Cinta desde 1 de Janeiro de 2011, havendo assinado um acordo de translação de responsabilidade com o anterior detentor, a Cooperativa Agrícola de Olivicultores de Moncorvo, CRL. Esta comunicação encon-

tra-se publicada no Diário da República, 2ª série nº 209, 31 de Outubro de 2011 (Aviso nº 21543/2011).

Em conformidade com as normas de produção de azeitona de conserva Negrinha de Freixo, no processamento deste tipo de azeitonas de mesa deverão ser utilizados frutos inteiros, são em estado de maturação conveniente, com forma arredondada, lisa, terminando em ligeiro bico e consistência firme, isento de defeitos e de matérias estranhas. A cor do fruto deverá variar de verde amarelado a negro violáceo, dependendo do tipo de azeitonas que se quer obter, o peso deverá situar-se entre 3 e 5 gramas em média e o volume entre 3 a 5 cm<sup>3</sup> (caderno de especificações).



**Figura 8-** Área geográfica do Concelho de Trás-os-Montes onde se recolheram as amostras de azeitona  
(Fonte: [ec.europa.eu/agriculture/quality/door/documentDisplay](http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/documentDisplay))

De acordo com o que está legislado na NP-3034 (1987) a colheita dos frutos deverá ser executada manualmente e, posteriormente, os frutos sujeitos à seleção por tamanhos, uma vez que apenas são consideradas DOP as azeitonas categorizadas na categoria extra e calibradas na classes de 201 a 400 frutos/kg de acordo com os critérios e tolerância estabelecidos.



# **Capítulo 3**

## **Material e Métodos**



### 3.1- Material vegetal

Para a realização deste trabalho escolheu-se a variedade Negrinha de Freixo, devido à sua importância económica na região Transmontana. A Negrinha do Freixo ocupa nesta região uma área geográfica que se estende pelos concelhos de Vila Nova de Foz-Côa, Freixo de Espada à Cinta, Torre de Moncorvo, Alfândega da Fé, Vila Flor, Mirandela e Macedo de Cavaleiros.

O trabalho experimental dividiu-se em três partes: uma primeira parte refere-se à colheita da azeitona, uma segunda à aplicação do tratamento de conservação e uma terceira ao procedimento analítico.

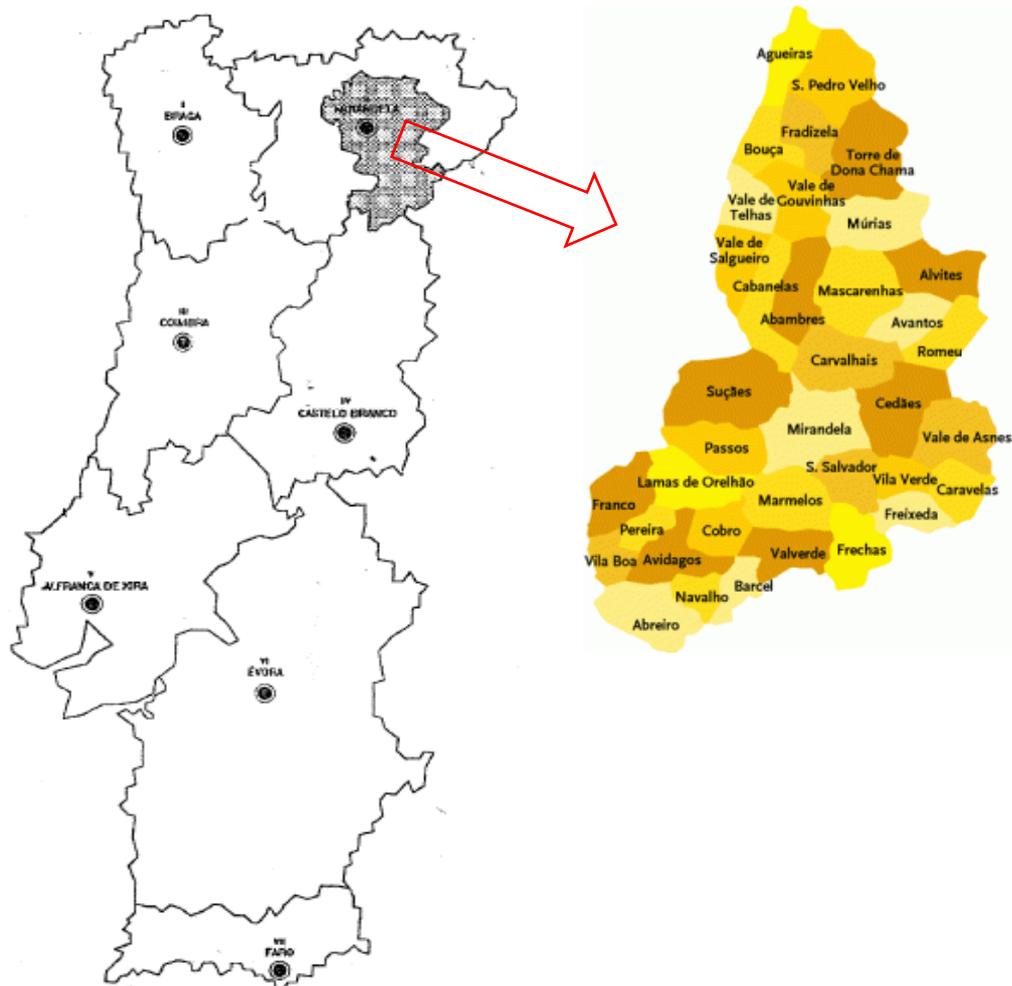
#### 3.1.1- Local de colheita e amostragem

As azeitonas que serviram para a realização deste estudo foram colhidas manualmente (Figura 9).



**Figura 9-** Colheita manual das azeitonas na propriedade Casa Santo Amaro

Num olival (*Olea europaea L. cv.*, Negrinha de Freixo) em regime de sequeiro, com compasso (7m x 7m) localizado em Mirandela, (40,5°N; 7,2°W), aldeia de Suções, na Terra Quente Transmontana, no Nordeste de Portugal (Figura 10).



**Figura 10-** Localização da propriedade onde se efetuou a colheita no Concelho de Mirandela (Suções)

O Olival é propriedade da *Casa de Santo Amaro* (Figura 11 A), que produz azeite DOP com o nome de Santo Amaro (Figura 11 B ). O olival enquadra-se numa área destinada à produção de azeitona DOP Negrinha de Freixo. A colheita realizou-se , durante o mês de Outubro de 2012. Os frutos encontravam-se num estado de maturação verde, com Índice de matura de zero, com textura rija.



**Figura 11 A e B-** Propriedade e azeite DOP produzido na Casa Santo Amaro

A colheita foi efetuada de forma aleatória em várias oliveiras, com diferentes exposições de forma a obter uma colheita mais representativa e uniforme possível. Os frutos foram colhidos e colocados em caixas próprias perfuradas (Figura 12) e foram transportadas até ao laboratório da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Foram recolhidas seis amostras, das quais três foram usadas como testemunha, e as outras três foram acondicionadas em atmosfera saturado de CO<sub>2</sub>.



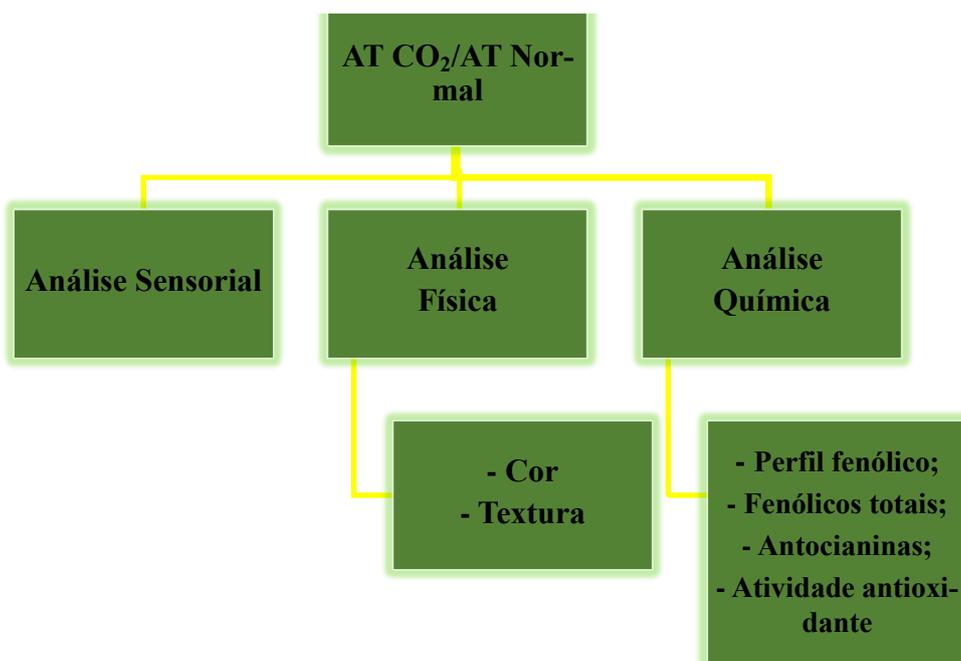
**Figura 12-** caixas perfuradas utilizadas para o transporte

### 3.2- Preparação das amostras

Assim que as amostras chegaram ao laboratório procedeu-se à seleção dos frutos da oliveira. Selecionados os frutos sem picadas de insetos, sem manchas ou feridas. Depois desta seleção, as amostras, foram divididas em dois grupos: um grupo de frutos destinado à conservação em atmosfera saturada com CO<sub>2</sub> e um outro grupo com frutos destinados à conservação sem CO<sub>2</sub>, designada por atmosfera normal. Após esta separação os frutos foram acondicionados, no escuro, respetivas condições em frascos herméticos (Figura 13) para posterior realização das análises físico-químicas (Figura 14) por datas de amostragem (Quadro 2) nas análises físicas (cor e textura) foram utilizados 6 frutos de cada lote das diferentes atmosferas.



**Figura13-** Seleção e armazenamento das azeitonas em atmosferas diferentes



**Figura 14-** Esquema ilustrativo das análises físico-químicas realizadas.

**Quadro 2-** Análises efetuadas por data de amostragem

Data de amostragem	Análise Sensorial	Análise de Cor	Análise de Textura	pH	Fenólicos totais/Antocianinas /carotenos	Fenólicos Individuais	Actividade antioxidante
(11-10-2012)	X	X	X	X	X	X	X
(15-10-2012)	X	----	----	X	----	----	----
(26-10-2012)	X	----	----	----	----	----	----
(31-10-2012)	----	X	X	X	----	----	----
(5-11-2012)	X	X	X	----	X	----	----
(9-11-2012)	----	X	X	X	X	----	----
(28-11-2012)	X	----	----	X	X	X	X

### 3.3- Análise Sensorial

A avaliação sensorial das azeitonas decorreu numa sala bem iluminada por lâmpadas fluorescentes (luz branca), com uma temperatura confortável para os provadores e com o mínimo de ruído. As amostras foram codificadas (Figura 15) de 1 a 6. A avaliação sensorial foi realizada por um painel de provadores com 8 elementos, aos quais foi previamente dada formação para este tipo de provas que se realizaram em 5 datas distintas, com intervalo de aproximadamente 10 dias, tendo decorrido 49 dias entre a primeira e a última.



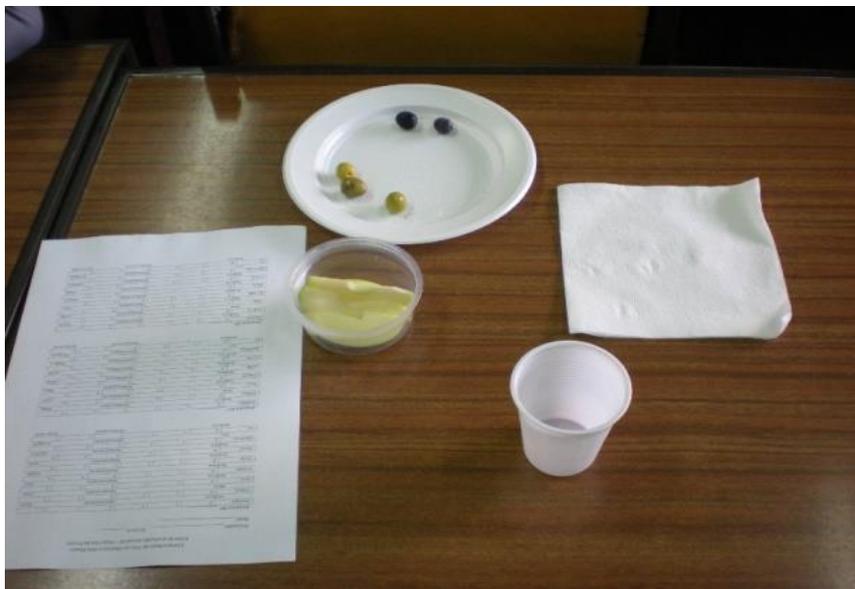
**Figura 15-** Amostras para análise sensorial

Para a análise sensorial, do respectivo lote foram amostras de azeitonas para cada provador, colocadas em sacos individuais e identificados apenas com números para saber o lote a que pertencia (Figura 16).



**Figura 16-** Azeitonas para fazer a análise da cor e textura.

As azeitonas foram colocadas em pratos com pedaços de maçãs laminadas, um copo de água, um guardanapo e as respectivas folhas de prova com os parâmetros de classificação (Figura 17).



**Figura 17-** Prova de Análise Sensorial.

No início das provas foi explicado a cada provador o que se pretendia em cada parâmetro, qual o modo correto de preenchimento da folha de prova. Na folha de prova para

além da avaliação dos parâmetros de análise de cada azeitona, constava um cabeçalho para preenchimento da identificação, género e data da prova. A lista de descritores da folha era composta pelo amargor, textura, doce, frutado, verde, odor e aspeto geral (aparência e cor). Cada amostra foi classificada em cada quadro de classificações. A escala que foi utilizada é de 0 a 5, para cada atributo a analisar em que 0 é a ausência e 5 é presença máxima. A folha de registo utilizada encontra-se em Anexo. Na (Figura 18) apresenta-se algumas fotografias da análise sensorial realizada.



**Figura 18-** Provas Organoléticas realizadas

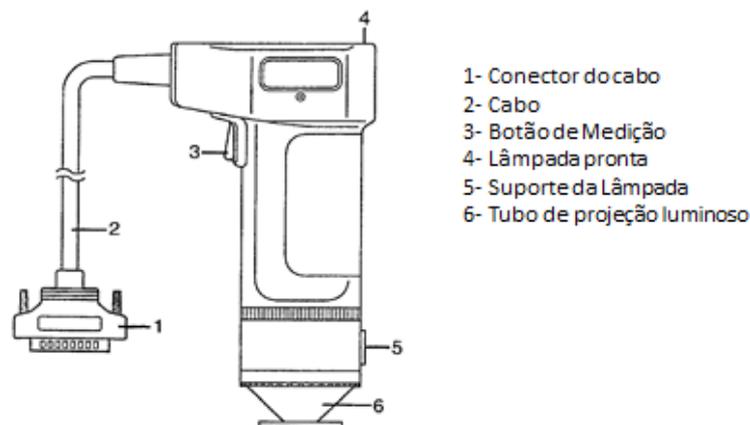
Com a análise sensorial pretendeu-se verificar a existência de diferenças entre as azeitonas mantidas em atmosfera normal e em atmosfera saturada com CO<sub>2</sub>.

### **3.3- Análise dos parâmetros físicos**

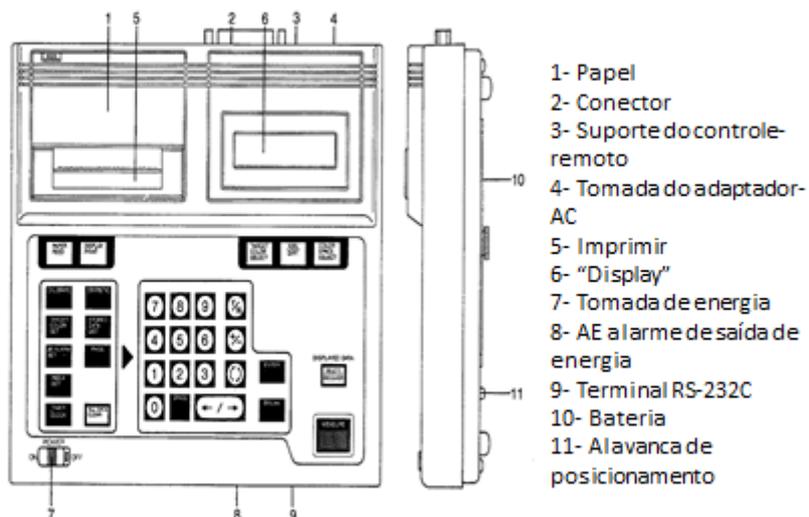
Para a análise da cor e da textura realizaram-se as operações que a seguir se descrevem, utilizando as azeitonas do respetivo tratamento e tempo de armazenamento.

### 3.3.1- Cor

Para a avaliação da cor das azeitonas, recorreu-se ao colorímetro (“Konica Minolta CR-300 CHROMA METER”) (Figura 19) com processador de dados “DP-301” (Figura 20), que quantifica a cor e pelo sistema de coordenadas “Hunter-Lab” (L, a, b). Em que: **a** define a tonalidade verde (-a) e vermelho (+a), tomando valores entre -100 e 100 respetivamente; **b** define os tons azul (-b) e amarelo (+b), tomando valores entre -100 e 100 respetivamente; **L** define a luminosidade, tomando valores entre 0 e 100 respetivamente que representam a cor negra (0) e a cor branca (100).



**Figura 19-** Colorímetro Konica Minolta CR-300 CHROMA METER(Fonte: <http://www.konicaminolta.com.cn/instruments/download/manual/pdf/CR-300.pdf>)



**Figura 20-** Processador de dados "DP-301" (Fonte:

<http://www.konicaminolta.com.cn/instruments/download/manual/pdf/CR-300.pdf>)

Segundo Yousfi *et al.* (2006) o Índice de cor (CI – Colour Index) é calculado:

$$CI = L (b - a) / 100 \text{ eq. (n}^\circ 1)$$

Para determinar a cor das azeitonas, realizaram-se, 6 medições por fruto, na zona equatorial do mesmo e em pontos equidistantes.



**Figura 21-** Determinação da cor, pelo sistema de coordenadas "Hunter-Lab".

### 3.3.2 – Análises de textura

O termo textura é de difícil definição, no entanto pode ser definido segundo a Norma ISO (1992) como sendo “o conjunto de propriedades mecânicas, geométricas e de superfície de um produto, detetáveis pelos recetores mecânicos e tácteis e eventualmente pelos recetores visuais e auditivos” (Alvarenga, 2000).

Existem vários tipos de instrumentos empíricos com capacidade para medir parâmetros de textura dos materiais, como é o caso do texturómetro, utilizado neste estudo (Figura 21). Este equipamento é constituído essencialmente por um braço comandado por computador que se move na vertical, com uma dada velocidade, com um determinado tipo de sonda e a uma determinada distância (Figura 22).



**Figura 21** – TA.XT PLUS (Texture Analyser). (Fonte:

<http://www.masontechnology.ie/files/images/products/sms1.jpg>)

O principal objetivo é o contato da sonda com a amostra a analisar, aplicando uma determinada força, provocando uma deformação nessa mesma amostra. Daí obtém-se curvas força *vs* tempo ou força *vs* distância, em que se regista a resposta do material a uma determinada solicitação (compressão, perfuração e etc...). Para a realização deste teste, os fatores de variação devem de ser minimizados, pois só assim pode haver comparações com o material em condições exatamente iguais. O tamanho e a forma das amostras, os tratamentos aplicados, a temperatura e o equipamento também devem ser

padronizados, nomeadamente o tipo de sonda utilizada e a velocidade da mesma, a distância das amostras e a geometria, forma e tamanho (Gaspar *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2010).

Neste estudo, para o teste de textura das azeitonas utilizou-se um texturómetro (“texture analyser”) modelo TA.XT PLUS cujo o sistema de análise é (“Stable Micro Systems”) com uma célula de carga de 5 kg, equipado com uma sonda cilíndrica de 2 mm com uma deslocação de penetração de 5 mm. Obteve-se uma curva de força *vs* distância para calcular a Força (N) exercida para ocorrer a rotura da epiderme da azeitona, nos diferentes tratamentos (Figura 22). No caso do mesocarpo, após a rotura da epiderme houve uma ligeira penetração nas primeiras camadas.



**Figura 22-** Determinação da textura, pelo texturómetro (modelo TA.XT).

### **3.4- Análise dos parâmetros químicos**

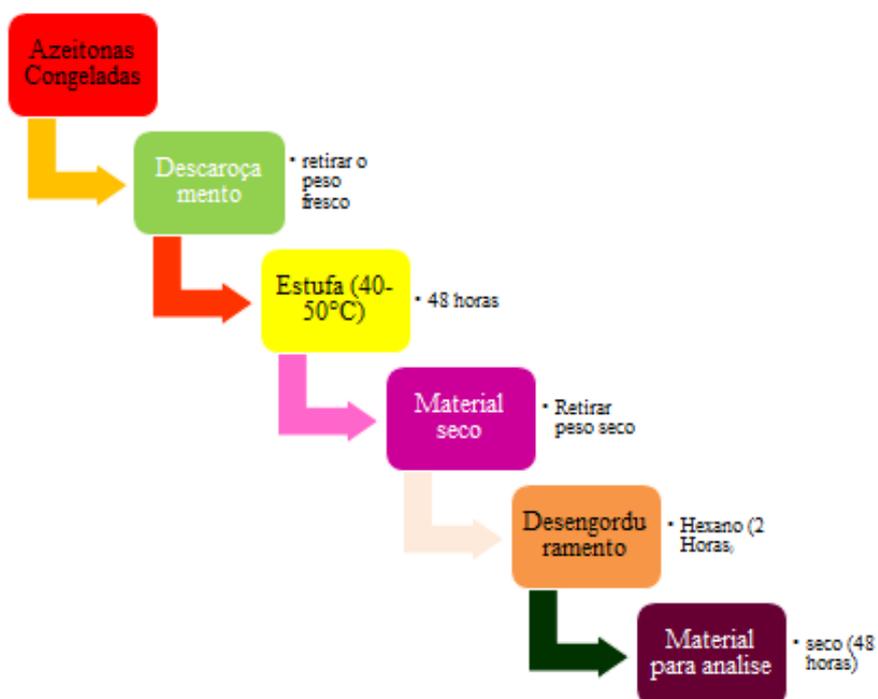
Para análise dos diferentes parâmetros químicos, em cada período de amostragem retiram-se 30 azeitonas de cada tratamento e conservaram-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior análise (Figura 23).



**Figura 23-** Seleção das azeitonas para as análises químicas.

### 3.4.1- Extração do extrato orgânico da azeitona

Para proceder à avaliação da influência da atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> sobre os parâmetros **químicos e bioquímicos** da azeitona de mesa Negrinha do Freixo, procedeu-se primeiro à obtenção de um extrato orgânico. O procedimento adotado apresenta-se de uma forma sumariada na (Figura 24).



**Figura 24-** Síntese do processo de preparação do extrato.

A partir das amostras selecionadas em cada um dos períodos de amostragem, retiraram-se 10 azeitonas, procedeu-se ao descaroçamento (Figura 25 A), removeu-se o endocarpo (caroço) com o auxílio de um bisturi. Seguidamente, registou-se o peso fresco das amostras descaroçadas, numa balança de precisão 0,001 g, modelo (Precisa 205A super Bal-series). De seguida as amostras foram colocadas em placas de Petri na estufa (Memmet series) a 50°C durante 48 horas (Figura 25 B) para remoção total da água.

Registou-se o peso seco (Figura 25 C) do mesocarpo até atingir peso constante (Precisa 205A super Bal-series) para determinar a matéria seca das amostras.



**Figura 25-** Processo de obtenção do extrato (A-Descaroçamento das azeitonas; B-Secagem em estufa; C-pesagem das azeitonas secas)

Em seguida, as amostras secas foram trituradas num moinho (Taurus Aromatic 150 W) (Figura 26 B), até se obter um pó fino (Figura 26 B). As amostras foram então acondicionadas em sacos com fecho fácil, os sacos foram todos colocados numa caixa para posterior extração (Figura 26 C).

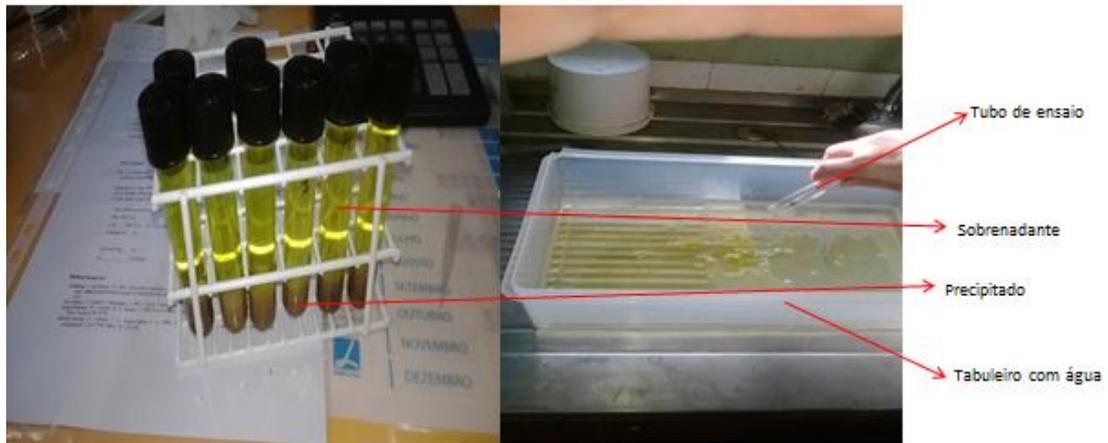


**Figura 26-** Preparação do extrato (A- moinho para triturar as azeitonas; B- pó fino obtido após a trituração; C- sacos usados para colocar as azeitonas trituradas)

De cada amostra de azeitona moída foi pesada 2 g, adicionou-se 10 ml de hexano, com o objetivo de remover a gordura e os pigmentos fotossintéticos, deixando-se à temperatura ambiente no escuro durante 2 horas, com agitação regular (Foto 27 A) (vortéx Labinco L 46) de 20 em 20 minutos. Para conseguir a total separação das moléculas de gordura do extrato orgânico a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, numa centrifugadora (Kubota 2100 (Foto 27 B), durante 15 minutos), rejeitou-se o sobrenadante (Figura 28) e aproveitou-se o precipitado. O precipitado resultante foi colocado a secar na estufa durante 24 horas.



**Figura 27-** Preparação do extrato: (A- Agitação no vortéx; B- Amostras na centrífuga)



**Figura 28-** Resultado ficou-se com o precipitado e eliminou-se o sobrenadante

### **3.4.2- Determinação de pH**

A determinação do pH foi efetuada em triplicado para cada amostra de cada tratamento. Descarçou-se aproximadamente 25 g de azeitonas congeladas, triturou-se com a varinha (Taurus BAPI 750) até se obter uma mistura líquida homogénea. Foi utilizado um potenciômetro (elétrodo de penetração da marca pH Meter 3305 (Jenway) para o efeito, cuja calibração foi realizada com soluções tampão comerciais de pH=7.01 e pH=4.01, à temperatura ambiente. Todos os valores foram registados numa folha de Excel.

### **3.4.3- Determinação do teor em compostos fenólicos totais e orto-difenóis**

A partir do material seco, obtido anteriormente, pesaram-se 40 mg para tubos de 10 mL de capacidade e adicionou-se 1 ml de metanol a 70%, agitou-se vigorosamente num vortex (Labinco L46). Seguidamente, colocou-se a mistura numa placa térmica (Thermobloc, FLAC.TD) durante 30 minutos a 70°C. Decorrido este período centrifugou-se a mistura a 4000 rpm durante 15 minutos (Sigma 2-16 K). Após a centrifugação aproveitou-se o sobrenadante e rejeitou-se o precipitado. O sobrenadante foi filtrado (Spartan 13/0,2 RC, 0,2 µm, Whatman<sup>TM</sup>) para pequenos frascos de vidro de 2 mL de capacidade. O extrato orgânico foi armazenado a -20°C até ser analisado. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Para tal, do extrato obtido recolheu-se 50 µL e adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin diluído a 10 % em água e 2 mL de carbonato de sódio diluído a 7%. A mistura foi a incubar durante 15 minutos a 45°C em banho-maria. Decorrido este tempo procedeu-se à leitura das absorvâncias das amostras contra a solução testemunha (solvente de extração em substituição do extrato) em espectrofotómetro (Hitachi U – 2000) a 760 nm. Simultaneamente procedeu-se à realização de uma curva de calibração com o fenólico comercial ácido gálico (Sigma-Aldrich) por forma a obter a equação matemática para quantificação dos compostos fenólicos totais nas amostras a analisar. O teor em compostos fenólicos totais foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) g<sup>-1</sup> de peso seco da amostra.

Relativamente à quantificação do teor em orto-difenóis, dilui-se 0,2 mL do extrato metanólico, com 1 mL de água ultrapura. Em seguida, adicionou-se 1 mL de 0,1 M da so-

lução tampão de fosfato (pH=6,5) e 2 mL de molibdato a 5%. Seguidamente, agitou-se a mistura no vórtex (Labinco L 46) e deixou-se a repousar no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo procedeu-se à leitura das absorvâncias a 350 nm no espectrofotómetro (Hitachi U – 2000) contra o branco. Simultaneamente procedeu-se à realização de uma curva de calibração com o fenólico padrão ácido caféico (Sigma-Aldrich). Na diluição da solução do ácido caféico e para a preparação do branco utilizou-se metanol a 70% (solvente de extração). Os resultados foram expressos em mg de ácido cafeico equivalente (EAC) g<sup>-1</sup> mg de peso seco.

### 3.4.4- Antocianinas totais

A determinação do teor em antocianinas totais foi realizada de acordo com o método de (Illand et al., 1996, 2000) com pequenas modificações. A partir do extrato seco pesou-se cerca de 1 g e adicionar 10 ml de etanol a 50% v/v. Taparam-se os frascos e a mistura foi deixada em repouso no escuro durante 1 hora, tendo-se tido o cuidado de a agitar de 10 em 10 minutos. Seguidamente procedeu-se à centrifugação da mistura a 4000rpm durante 15 minutos (Kubota 2100), filtrou-se (Whatman n°4) e recolheu-se o sobrenadante. O sobrenadante foi considerado o “extrato”.

Após a extração, num tubo de ensaio colocamos 200 µL do extrato anterior e adicionou-se 3,8 mL de HCl 1 M, e deixou-se em repouso no escuro durante 3 horas. Prontamente, mediram-se as absorvâncias a 520 nm em espectrofotómetro (Hitachi U-2000) contra branco (HCl em vez de extrato). Para calcular a concentração das antocianinas totais (AT) que se expressam em mg.g<sup>-1</sup> de peso seco, utilizou-se a seguinte fórmula, adaptada pelo modelo de Lambert-Beer:

$$AT = [\text{Abs } 520 \text{ nm} / (\epsilon \times 1 \times \text{peso da amostra extraída (g)})] \times MW \times 10^3 \times \text{volume final extraído (mL)} \times DF \text{ (eq n}^\circ 2)$$

DF- Fator de diluição, neste caso é 20, porque usamos 200 µL de HCl a 1M.

MW- peso molecular das antocianinas de referência usadas para quantificar os níveis de AT.

$\epsilon$  – Coeficiente de absorvância.

### 3.4.5-Determinação e quantificação dos teores em $\alpha$ e $\beta$ -caroteno

Para a quantificação do teor em  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno seguiu-se a metodologia colorimétrica de Scott *et al.* (2001) e Lui *et al.* (2011). Assim, do extrato obtido no item 3.4.1, pesou-se cerca de 200 mg de cada extrato seco, adicionou-se 10 mL de hexano (Sigma-Aldrich), agitou-se vigorosamente no vortéx (Labinco L 46) e deixou-se a mistura em repouso, no escuro, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período de tempo centrifugaram-se as amostras (Kubota 2100) a 4000 rpm durante 5 minutos. Depois, filtrou-se o sobrenadante em papel de filtro Whatman nº4 e leram-se as absorvâncias a dois diferentes comprimentos de onda (445 e 450 nm) contra o branco (hexano em vez do extrato). A concentração de  $\alpha$ - caroteno e  $\beta$ -caroteno foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $[ ] \mu\text{g.mL}^{-1} = \text{Abs} \times 10^4 / A^{1\%}$ . Em que Abs representa a absorvância a que é lida a amostra e  $A^{1\%}$  o coeficiente de extinção para o  $\alpha$ -caroteno (2170) e  $\beta$ -caroteno (2592), de acordo com Scott *et al.* (2001) e Lui *et al.* (2011). Os resultados foram expressos em mg de carotenos  $\text{g}^{-1}$  peso seco.

### 3.4.6-Perfil em Fenólicos individuais

A identificação e quantificação dos principais fenólicos individuais foram realizadas em HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por díodo array).

Numa primeira fase, procedeu-se à extração e preparação das amostras e numa segunda fase procedeu-se à realização da análise em HPLC. Assim, na fase de extração pesaram-se 40 mg de peso seco cada uma das amostras vegetais para microtubos com tampa de 2 mL e adicionou-se 950  $\mu\text{L}$  de metanol a 70 % e 50  $\mu\text{L}$  de padrão interno (naringina, Sigma-Aldrich). Seguidamente, os microtubos contendo extratos foram colocados num bloco de aquecimento (Thermobloc) a 75°C durante 30 minutos, sendo agitados no vortéx a cada 5 minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se à centrifugação dos extratos a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Sigma). Recolheu-se e filtrou-se (Spartan 13/0,2 RC, 0,2  $\mu\text{m}$ , Whatman<sup>TM</sup>) o sobrenadante para vials de HPLC e rejeitou-se o precipitado, os quais foram mantidos a -20°C até sua análise. A partir daqui procedeu-se à identificação e quantificação dos fenólicos individuais por HPLC-DAD equipado com uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Spherisorb ODS2, PhaseSeparations da Ace), uma fase móvel de água com 0,1% de ácido tricloro-

acético (TFA) (solvente A) e acetonitrilo (acetonitrilo, CH<sub>3</sub>CN, HPLC gradient, Merck) com 0,1% de TFA (solvente B). A eluição foi realizada a um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, com o seguinte gradiente: 0 minutos 100% do solvente A e 0% do solvente B, 5 minutos 100% do solvente A e 0% do solvente B, 15 minutos 80% do solvente A e 20% do solvente B, 30 minutos 50% do solvente A e 50% do solvente B, 45 minutos 0% do solvente A e 100% do solvente B, 50 minutos 0% do solvente A e 100% do solvente B, 55 minutos 100% do solvente A e 0% do solvente B e nos 65 minutos 100% do solvente A e 0% do solvente B. O volume de injeção foi de 20 µL. Os cromatogramas foram registrados a 280, 320, 370 e 520 nm. A identificação dos compostos fenólicos individuais foi feita por comparação com padrões comerciais externos (Extrasynthese, França), através dos respectivos tempos de retenção e espectros. A quantificação foi feita utilizando parâmetros como o volume de extração, volume de injeção, área do padrão interno e área do composto em questão. Os resultados foram expressos em µg.g<sup>-1</sup> de peso fresco. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

### **3.5- Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante foi determinada através da análise de três métodos colorimétricos: efeito bloqueador dos radicais DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), determinação do poder redutor (redução de Fe<sup>3+</sup> em Fe<sup>2+</sup>) e pelo método de eliminação de radicais de ABTS<sup>+</sup> (radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)).

#### **3.5.1- Método do efeito bloqueador dos radicais de DPPH**

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, foi realizado de acordo com Sánchez – Moreno (1998), com ligeiras modificações. O método foi conduzido em tubos de ensaio e depois colocado em cuvetes. Assim, em cada tubo de ensaio, colocou-se 100 µL dos extratos a 5 mg.mL<sup>-1</sup> e adicionou-se 100 µL de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH (6 x 10<sup>-5</sup> M). A mistura foi colocada no escuro durante 60 minutos à temperatura ambiente. Terminando este período, procedeu-se à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro Hitachi U – 2000 Spectrophotometer, a 517 nm. Os resultados são expressos em percentagem, através da seguinte equação que corresponde a quantidade de DPPH aprisionado pelos compostos antioxidantes nas amostras:

$$\% \text{ AA} = [(Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostras}}) / Abs_{\text{amostra}}] \times 100 \text{ eq. n}^{\circ}3$$

Fez-se igualmente a leitura de um branco (solvente preparado das amostras) como se fosse uma amostra, por forma a ser utilizado na equação matemática que foi utilizada na quantificação da atividade antioxidante. Todas as determinações foram feitas em triplicado e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média (SD) das três repetições.

### 3.5.2- Determinação do poder redutor ( $\text{Fe}^{3+}$ , em $\text{Fe}^{2+}$ ).

O poder redutor das amostras foi determinado pelo método de Gülcin (2006). De cada mostra foi retirado 1 mL e adicionado 2,5 mL de solução tampão fosfato (pH= 6,6 0,2 M) e 2,5 mL de solução aquosa de ferrocianeto de potássio (Sigma - aldrich). Após a agitação em vortéx Labinco L 46, incubou-se a mistura a 50°C durante 30 minutos. Decorrido este período de tempo adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (Sigma-Aldrich) à mistura, sendo esta agitada em vortéx Labinco L 40. Em seguida foram recolhidos 2,5 mL da mistura para tubos de ensaio de 10 mL e adicionados 2,5 mL de água destilada. No ensaio do poder redutor, a presença de agentes redutores provoca a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ , ferricianeto a uma forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Dessa forma, a formação de azul “Perl’s Prussian”, medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ . Após a adição de cloreto de ferro (III) procedeu-se à leitura da absorvância em espectrofotómetro (Hitachi U- 2000) para um comprimento de onda 700 nm.



Figura 29 – Ensaio para quantificação da atividade antioxidante.

Neste método de avaliação, os valores de absorvância medidos no espectrofotômetro a 700 nm são considerados suficientes para demonstrar a capacidade antioxidante das amostras. No entanto, também é frequente usar um composto com atividade antioxidante para efetuar uma curva de calibração que servirá para encontrar uma equação que permitirá expressar a atividade antioxidante em mg de equivalentes  $\text{g}^{-1}$  de peso seco. E foi o que optamos por realizar neste estudo.

Com a determinação do poder redutor das azeitonas, efetuamos uma curva de calibração com diferentes concentrações de ácido ascórbico, um conhecido composto antioxidante cuja equação encontrada foi a seguinte:  $Y = -6,3807x + 0,8309$ . Esta equação irá servir para expressar a atividade antioxidante do poder redutor em mg de equivalentes de ácido ascórbico  $\text{g}^{-1}$  peso seco.

### **3.5.3- Determinação do efeito de captura de radicais de ABTS<sup>+</sup>**

A determinação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical ABTS<sup>+</sup> segundo o método descrito por Sratil (2006) com ligeiras modificações. Esse método normalmente designado por métodos de ABTS está baseado na capacidade antioxidante em capturar o catião ABTS<sup>+</sup>. Para a determinação da atividade antioxidante através deste método preparou-se antecipadamente a solução ABTS<sup>+</sup> a partir de 7 mM de Persulfato de Potássio (Sigma-Aldrich) com 4,95 mM de ABTS (Sigma-Aldrich) em metanol. A solução ficou em repouso, no escuro, durante pelo menos 16 horas à temperatura ambiente para formar catiões radicais ABTS<sup>+</sup>. Esta solução é considerada solução stock. Em seguida dilui-se esta solução stock em metanol 50% até se obter absorvâncias compreendidas entre 0,70 e 0,85 a 734 nm. Esta solução foi então utilizada na determinação da atividade antioxidante. A partir do extrato preparado a uma concentração de 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  foram aplicados 50  $\mu\text{L}$  em tubos, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução ABTS<sup>+</sup>. E colocou-se os tubos com a mistura, ficou em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Decorrido este período de tempo as absorvâncias foram a 734 nm em cuvetes no espectrofotômetro. Este método baseia-se na geração ABTS<sup>+</sup> que apresenta cor azul esverdeado por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio, com a adição de um antioxidante ocorre a redução de ABTS<sup>+</sup> a ABTS promovendo a perda da coloração.

Com a perda da cor, a percentagem de inibição é determinada em função do branco, de amostra e/ou padrão, através da seguinte fórmula:

$$\% AA = [(Abs_0 - Abs amostra) / Abs_0] \times 100 \text{ (eq n}^\circ 5)$$

O valor de  $Abs_0$  é dado pelo valor que representa a absorvância do ABTS sem extrato. Todas as determinações foram feitas em triplicado. E as percentagens de atividade antioxidante foram expressas como a média  $\pm$  desvio padrão da média (SD) das 3 repetições.

### **3.7- Análise estatística**

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o software SPSS, Statistics versão 19, IBM, Sun Microsystems, Inc, USA. Os dados obtidos foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão da média de ensaios efetuados em triplicado. As diferenças entre as médias foram determinadas por análise da variância (ANOVA), e calculadas pelo teste de Tukey, para a probabilidade  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , considerando-se como significativa (\*), muito significativa (\*\*), e altamente significativa (\*\*\*), respectivamente.

# **Capítulo 4**

## **Resultados e Discussão**



#### 4.1.- Análise sensorial

Os resultados (Figura 30) foram obtidos pela mediana dos valores de cada atributo avaliado pelo painel de provadores. A análise dos resultados indica para uma redução do atributo amargor mais acentuada nas azeitonas mantidas a atmosfera saturada com CO<sub>2</sub>, enquanto nas azeitonas submetidas à atmosfera normal, a sensação de amargor diminuiu apenas na última amostragem (28-11-2012) cuja mediana passou de 5 para 4,5 correspondendo a uma taxa de redução de 10%. Já na atmosfera saturada de CO<sub>2</sub>, observou-se uma redução ao longo de todo o período de armazenamento que foi mais acentuada a partir do 15º dia (a mediana passou de 5 para 3), com uma taxa de redução de 40% (Figura 30) que se manteve até ao final do estudo. Assim o armazenamento em CO<sub>2</sub> permite um aumento de 30% na redução do atributo amargor em relação a atmosfera normal. Nestas últimas condições de armazenamento a ligeira perda de amargor poderá ser atribuída ao fato de no final do estudo o estado de maturação ter avançado (observando-se uma coloração violeta) o que implica uma redução dos compostos fenólicos com o avançar da maturação já observado noutros estudos em cultivares Portuguesas (Machado *et al.*, 2013). Estes resultados parecem indicar que a atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> tem um efeito benéfico na redução deste atributo. Esta redução poderá estar relacionada com uma eventual diminuição do teor da oleuropeína, principal composto fenólico responsável por esta característica organolética. Em relação às outras características sensoriais olfato-gustativas como a textura, frutado, odor. Com este ultimo parâmetro e de acordo com Dourtoglou *et al.* (2006) pretendeu-se observar a evolução do cheiro de verde/folha até ao cheiro característico da azeitona quando atinge a maturação Ainda de acordo com estes autores, ao avaliar a aparência pretendeu-se observar se a azeitona mantém as características que os consumidores estão habituados.

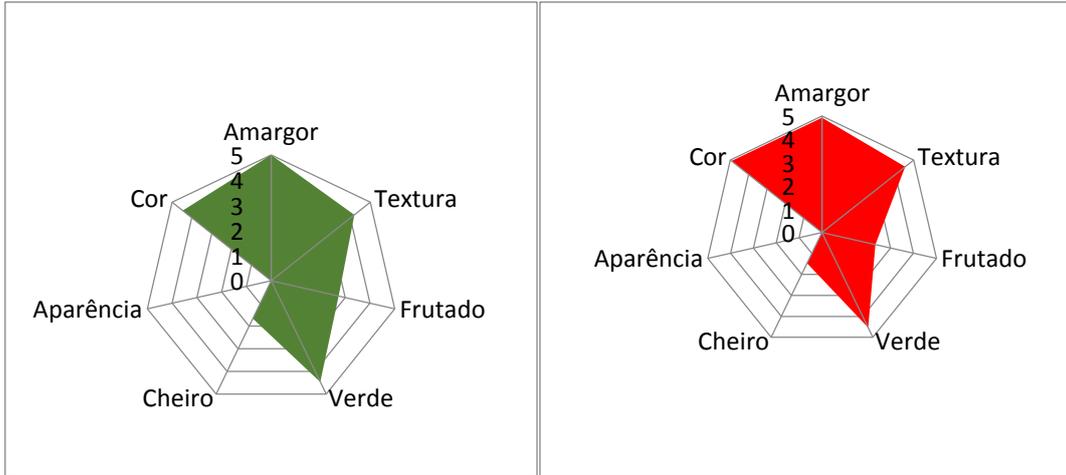
Ao longo do período de amostragem verificou-se que foram ocorrendo modificações nos diferentes atributos sensoriais (Figura 30). De um modo geral, a aparência (firmeza da polpa e cor perceptível pela vista humana), houve alterações mais importantes nas amostras da atmosfera normal. Neste tratamento, observou-se que as azeitonas perderam rapidamente a firmeza da polpa ficaram com uma textura menos firme e com uma coloração pouco verde, apesar de colhidas num estado de maturação verde palha, o processo de maturação teve continuidade durante o período de armazenamento. As azeitonas sujeitas à atmosfera de CO<sub>2</sub> apresentaram ligeiras a quase nulas alterações da firmeza da polpa e cor visual, mantendo a firmeza e a cor verde desejadas no produto final. Já rela-

tivamente ao odor observou-se que foi mais intenso na atmosfera normal do que na atmosfera de CO<sub>2</sub>.

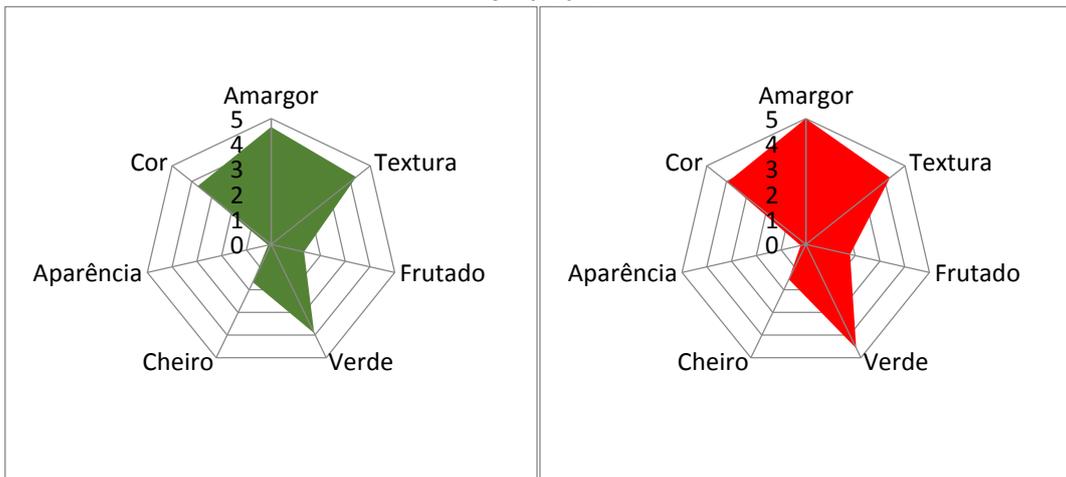
Relativamente ao aspeto visual da azeitona não se observou alterações importantes em ambas as condições de conservação, mas ainda assim e de acordo com o painel de provadores, no final do ensaio as azeitonas mantidas sob atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> apresentavam-se com uma aparência mais lisa, do que as mantidas sob atmosfera normal, uma vez que estas foram perdendo água enrugando ligeiramente, observando na atmosfera rica em CO<sub>2</sub> no final das provas um ligeiro frutado a maçã. Assim, os resultados parecem indicar que a conservação das azeitonas em atmosfera saturada com CO<sub>2</sub> pode permitir uma melhor preservação da aparência visual.

A resposta da azeitona a perda de amargor sobre a atmosfera de CO<sub>2</sub> depende fundamentalmente da cultivar da região e das técnicas culturais, por exemplo no estudo de Dourtoglou *et al.* (2006), desenvolvido na Grécia observou-se que na cultivar em estudo a redução do amargo foi perceptível pela análise sensorial logo no 3º dia de armazenamento na atmosfera em CO<sub>2</sub>, sendo mais notória a partir do 7º dia de armazenamento na atmosfera a cima mencionada; enquanto no nosso estudo cultivar Negrinha de Freixo só foi possível ter a perceção da diminuição da amargura apenas a partir do 15º dia que foi sem dúvida onde se observou a maior taxa de redução (60%). Acresce ainda que na análise sensorial foi perceptível o frutado a outros frutos nomeadamente a maçã apenas nas duas últimas amostragens. Já no estudo desenvolvido na Grécia como anteriormente já referido esta perceção foi logo notada no 7º dias de armazenamento, o que é um período notavelmente mais curto do que observado no nosso estudo. Em relação à aparência e comparando com o mesmo estudo verificamos que os resultados são semelhantes, na atmosfera normal verifica-se que as azeitonas ficam enrugadas e com uma cor visual menos atrativa.

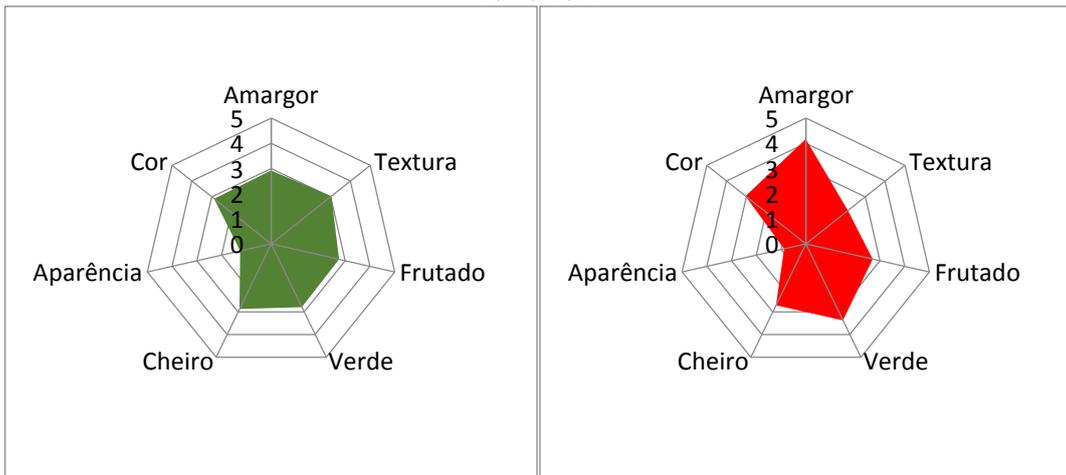
11-10-2012



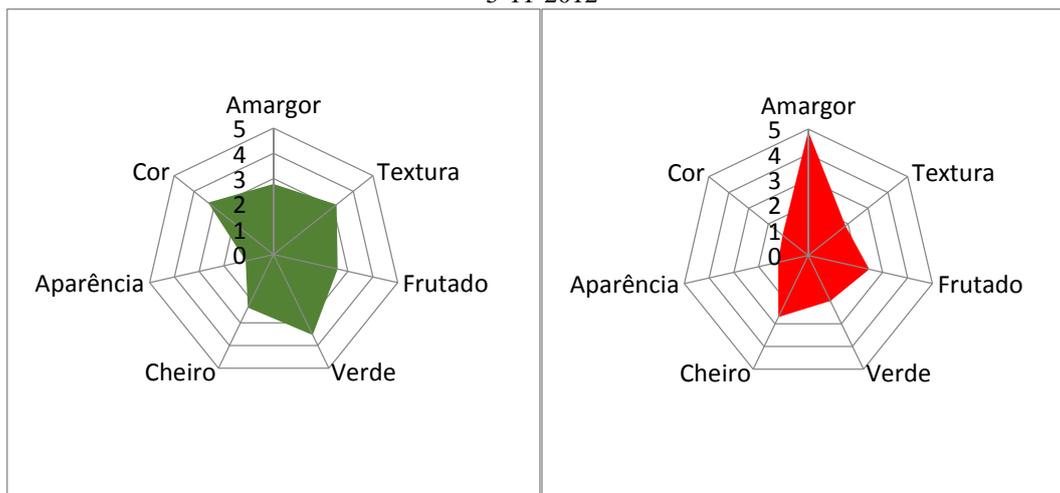
15-10-2012



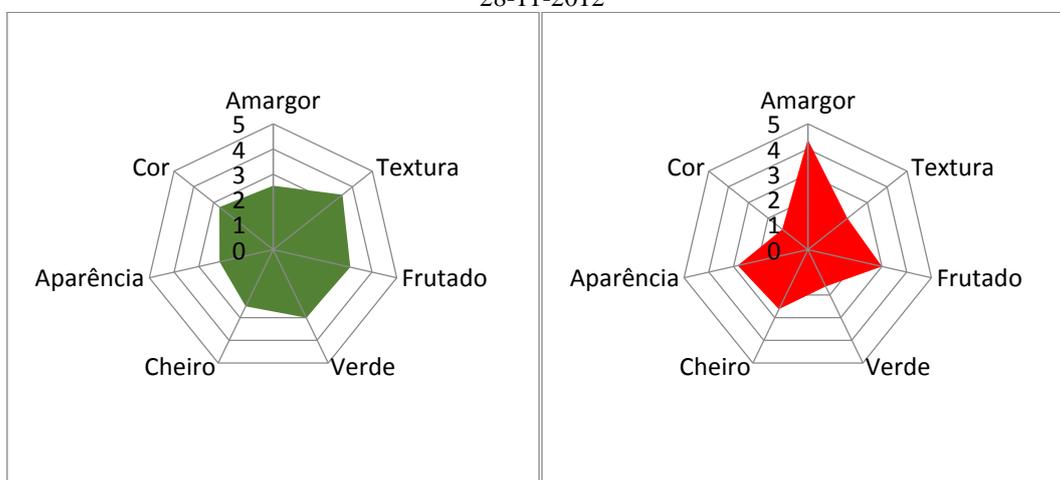
26-10-2012



5-11-2012



28-11-2012



**Figura 30-** Resultados obtidos da análise sensorial ao longo do armazenamento em períodos diferentes, os valores correspondem a mediana de cada um dos atributos avaliados pelo painel de provadores, os gráficos verdes correspondem a atmosfera de CO<sub>2</sub> e os gráficos vermelhos atmosfera normal.

## 4.2.- Parâmetros físicos

### 4.2.1 – Cor

A cor das azeitonas é fundamental e é um dos primeiros critérios que o consumidor adota na hora de escolher azeitonas. Assim, tendo isso em consideração, a cor foi um parâmetro de atenção ao longo deste estudo. A Figura 31 resume a informação obtida durante este trabalho, nomeadamente os parâmetros de cor **L** (luminosidade), e **CI** (Índice de cor).

A análise estatística demonstrou que os valores de **L** e **CI** foram afetados de forma altamente significativa ( $P < 0,001$ ) pela atmosfera e data de amostragem.

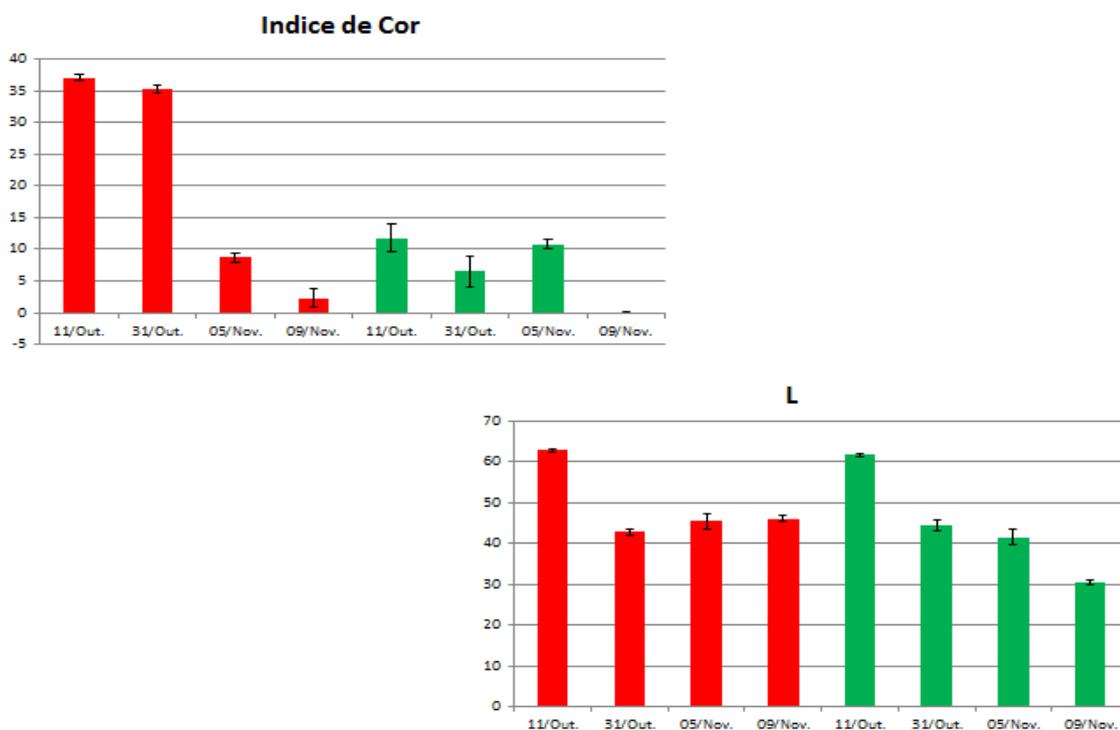
De acordo com os dados obtidos (Figura 31), a luminosidade (**L**) no início da amostragem foram iguais com valores de 60%. Na atmosfera normal este parâmetro decresce sempre ao longo das diferentes datas verificando-se que é maior da primeira data para a última data, a que corresponde uma taxa de decréscimo cerca de 67% e o valor de luminosidade foi de 20%. Já na atmosfera de  $\text{CO}_2$  o decréscimo verificou-se da primeira para a segunda datas amostragem de 60% para 45%, a que corresponde uma taxa de redução de 29%, ou seja metade em relação ao outro tratamento. A luminosidade das azeitonas na última amostragem na atmosfera normal representou menos de metade (44%) em relação às da atmosfera de  $\text{CO}_2$ . Estes resultados indicam que as azeitonas mantidas em  $\text{CO}_2$  a cor verde foi mais preservada. Já as do tratamento em atmosfera normal com valores menores (mais próximos do zero) o que representa uma tonalidade mais escura, ou seja, cor violeta de acordo com a análise sensorial no atributo da cor visual.

No que se refere ao índice de cor (**CI**) que está associado à maturação, ou seja, quanto mais próximo de zero for o **CI** indica que a maturação da azeitona está num estado avançado por Peres *et al.* (2012). Os resultados do Índice de cor é um método mais objetivo que outros métodos como o índice de maturação, **IM**, (determinado de acordo com o método descrito por Beltrán *et al.* (2008) uma vez que se baseia na observação visual de 100 frutos que são classificados em 7 escalas de acordo com a coloração da epiderme e da polpa), uma vez que os resultados obtidos pelo **CI** não depende do operador ao contrário de outros métodos e permite ultrapassar a dificuldade na distinção entre frutos verdes e verdes amarelos nos estados iniciais de maturação.

Em qualquer data de amostragem as azeitonas mantidas em atmosfera normal observou-se um índice de cor baixo (10), diminuindo até valores nulos na última data de amostragem. Os valores baixos de CI atribuem-se possivelmente ao escurecimento do fruto em fase avançada de maturação devido ao desaparecimento dos tons vermelhos e amarelos (Peres *et al.*, 2012). Segundo os autores Yousfi *et al.* (2006) em frutos da variedade “Arbequina” e “Picual” referem igualmente um decréscimo do **CI** ao longo da maturação. Sendo assim, em relação ao nosso estudo, observamos que corrobora com os resultados obtidos pelo estudo.

Nas primeiras duas amostragens, na atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>, as azeitonas apresentam um índice de coloração cerca de 37,5, indicando que as azeitonas se encontram num estado verde/amarela, o que coaduna com a relação significativa ( $R^2$  0,990;  $p \leq 0,01$ ) observada no estudo de ao estabelecer uma correlação entre o índice de maturação e o índice de cor a que a título de exemplo a um valor de CI próximo de 32 corresponde um IM entre 0 e 1, mais próximo de zero. Neste tratamento foram detetáveis pequenas diferenças entre a 1<sup>a</sup> e a 2<sup>a</sup> data de amostragens, as quais não são consideradas importantes. Já da 3<sup>a</sup> para a 4<sup>a</sup> os valores diminuem para menos de um terço em relação às outras datas, possivelmente ao facto das amostras terem sido recolhidas de outro frasco que foi apenas aberto pela primeira vez na 3<sup>a</sup> data de amostragem.

Na atmosfera normal os valores de CI da primeira data são cerca de 12, o que representa cerca de 30% em relação ao CI da atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> nas mesmas datas de amostragem; de salientar que na última data de amostragem os valores de CI foram muito próximos de zero (quanto mais próximo de zero mais escuro é o fruto) a que corresponde um índice de maturação entre 3 e 4 (Peres *et al.*, 2012), representando o 1<sup>o</sup> valor uma coloração da epiderme vermelha/ roxa em mais de metade do fruto, correspondendo ao final do pintor e o 2<sup>o</sup> valor corresponde a pele negra e polpa branca.



**Figura 31-** Resultados dos parâmetros para avaliação da cor. L- Luminosidade, CI- Índice de cor. Os resultados correspondem à média, n = 6. A cor vermelha representa a AT CO<sub>2</sub> e o verde o AT Normal

## 4.2.2 – Análises da textura

Na avaliação da textura foram avaliados 3 parâmetros gradiente (N/m), força (N) e polpa média (N) (Quadro3), A análise estatística dos dados gradiente e força mostrou que o tipo de atmosfera teve um efeito altamente significativo ( $P < 0,001$ ). De um modo geral constatamos que ao longo das datas de amostragem, o gradiente e a força aplicadas para romper a epiderme da azeitona foram sempre mais elevados na atmosfera saturada de  $CO_2$  do que na atmosfera normal. As azeitonas mantidas sob  $CO_2$  mantiveram uma textura que é desejada para as azeitonas de mesa, ou seja mais rijas e consistentes, enquanto na atmosfera normal as azeitonas vão ficando “moles” com o decorrer do tempo, o que se reflete numa epiderme menos rija e mais sensível à pressão e ao toque, o que poderá ser atribuído talvez ao amadurecimento que ocorreu ao longo do armazenamento já referenciado nos pontos anteriores.

**Quadro 3-** Valores médios (n = 6) dos diferentes parâmetros físicos da análise da textura<sup>1</sup>

<b>Data de amostragem</b>	<b>Atmosfera</b>	<b>Gradiente (N/m)</b>	<b>Força (N)</b>	<b>Polpa Média (N)</b>
11-10-2012	CO2	3743,0 ± 248,11	7,9 ± 0,33	1,6 ± 0,17
11-10-2012	Normal	2847,0 ± 231,11	6,1 ± 0,27	1,2 ± 0,15
31-10-2012	CO2	3130,7 ± 274,17	7,4 ± 0,40	1,5 ± 0,29
31-10-2012	Normal	1670,0 ± 163,91	4,2 ± 0,27	0,9 ± 0,26
05-11-2012	CO2	2640,8 ± 234,93	7,5 ± 0,43	1,8 ± 0,32
05-11-2012	Normal	1452,5 ± 55,09	3,7 ± 0,14	1,2 ± 0,22
28-11-2012	CO2	2397,0 ± 213,68	7,1 ± 0,51	0,8 ± 0,09
28-11-2012	Normal	1391,0 ± 53,45	3,5 ± 0,24	0,72 ± 0,14
<b>Significância</b>				
Data de amostragem (C)		***	***	**
Atmosfera (A)		***	***	*
C x A		n.s	*	n.s

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± erro padrão de três repetições e analisados estatisticamente para os níveis de significância n.s. (não significativo,  $p > 0,05$ ); \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

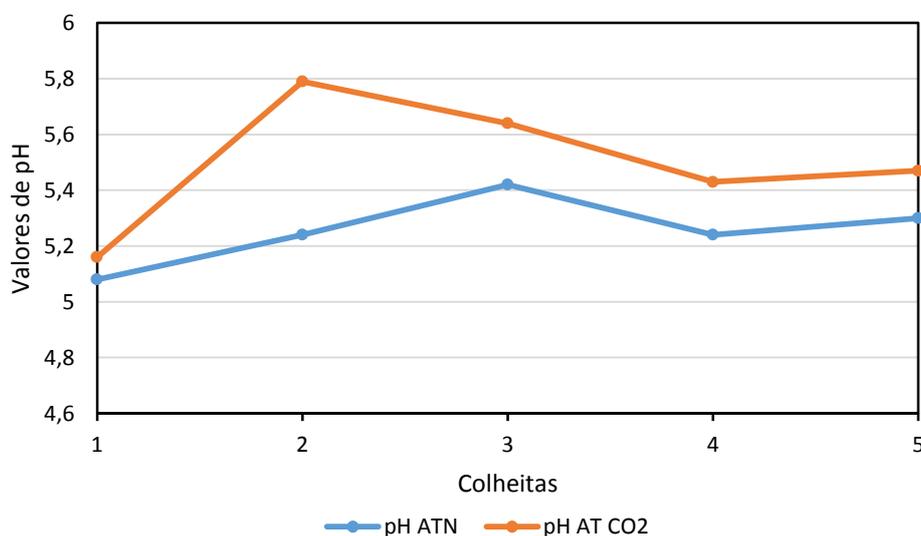
No que diz respeito à penetração na polpa verificamos também que os valores foram influenciados de forma significativa pelo tipo de atmosfera ( $P < 0,01$ ). De um modo

geral para ambos os tratamentos foram diminuindo ao longo do tempo, mas de forma mais acentuada nas azeitonas sob atmosfera normal. Os valores médios obtidos foram sempre superiores na atmosfera saturada de CO<sub>2</sub>. Os resultados encontrados no que concerne a textura não são discutidos e comparados com outros estudos uma vez que na pesquisa bibliográfica que foi realizada, não encontramos estudos que contemplem este tipo de análises.

## 4.2.- Parâmetros químicos

### 4.2.1.-pH

O pH é um parâmetro que é necessário controlar na maioria dos alimentos. Na Figura 32 encontra-se representado os valores de pH determinados em cada data da amostragem. Observou-se que as azeitonas sob atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> apresentaram valores médios de pH ligeiramente superiores aos das azeitonas sujeitas a atmosfera normal. No entanto, em ambas as atmosferas as azeitonas apresentaram valores médios superiores a 5.0 aproximando-se no final dos ensaios a valores muito próximos da neutralidade.



**Figura 32** - Valor do pH nas diferentes amostragens elaboradas no presente estudo.

#### **4.2.2-Composição fenólica; orto-difenóis; antocianinas totais e teores de $\alpha$ e $\beta$ -caroteno**

Os dados obtidos para os teores médios em compostos fenólicos totais, orto-difenóis, antocianinas totais e  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno são apresentados no Quadro 4.

De um modo geral, verificamos que quer o tipo de atmosfera quer o tempo de armazenamento influenciaram de forma significativa ( $P < 0,05$ ) apenas o teor em fenólicos totais (Quadro 4). Quanto aos restantes parâmetros o efeito foi não significativo ( $P > 0,05$ ). Foi possível verificar que quer fenólicos totais quer orto-difenóis totais, em ambas atmosferas, diminuíram ao longo do período de amostragem, enquanto os teores médios de antocianinas totais,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno mantiveram-se mais ou menos constantes.

Um dos aspetos mais importantes na maturação da azeitona em conservação é a evolução do teor em compostos fenólicos, por estes estarem associados à evolução do amargor das mesmas (Garcia *et al.*, 2003). De acordo com Garcia *et al.* (2003) e Dourotoglou *et al.* (2006), a diminuição do amargor das azeitonas, durante o período de maturação e fermentação, está diretamente relacionado com a diminuição dos compostos fenólicos, sobretudo da oleuropeína. Este composto, segundo os mesmos autores é responsável pelo amargor típico da azeitona no início do processamento. Assim, com base nestes resultados, ainda que preliminares, parece-nos que o armazenamento em atmosfera saturada em  $\text{CO}_2$ , uma vez que leva à diminuição do teor de oleuropeína, parece ser um método de processamento adequado para a desamerização das azeitonas, no caso particular da cultivar Negrinha do Freixo. Salienta-se ainda o fato que no processo de desamerização por este método não há consumos de água nem a produção de efluentes, o que indica ser um método mais ecológico respeitador do ambiente.

Relativamente aos teores médios em orto-difenóis, estes, tendem a seguir a tendência dos fenólicos totais. Aliás, segundo Gouveia *et al.* (2003) a variação em orto-difenóis é diretamente proporcional à variação do teor em fenólicos totais. Situação idêntica foi observada no presente trabalho em que uma diminuição de fenólicos totais implicou também uma redução em orto-difenóis, sobretudo na atmosfera saturada em  $\text{CO}_2$ , onde a redução foi mais acentuada.

No que se refere ao teor médio em antocianinas (Quadro 4) verificamos que não houve diferenças significativas entre os dois tratamentos, ( $p > 0,05$ ). No desenvolvimento e aparecimento das antocianinas de acordo com Soler-Rivas *et al.* (2000) pode-se

identificar 3 fases distintas: na primeira fase de crescimento, durante a qual existe a acumulação de oleuropeína; na segunda fase a fase de maturação verde que coincide com a redução dos níveis de clorofila e oleuropeína; e na terceira fase, chamada fase de maturação preta que se caracteriza pelo aparecimento de antocianinas e durante o qual os níveis de oleuropeína diminuem de uma forma mais acentuada.

Já no que alude aos teores médios em  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, analisando o (Quadro 4), verificamos que apesar das diferenças de teor médio, não terem sido significativas, os maiores teores obtiveram-se nas azeitonas em atmosfera saturada em CO<sub>2</sub> e neste tipo de atmosfera aumentaram com o tempo. Esta tendência não se verificou nas *azeitonas* mantidas em atmosfera normal. Segundo Howar *et al.* (2000), os carotenos tendem a aumentar com o amadurecimento dos frutos e vegetais, o que apenas se confirmou para as azeitonas mantidas em CO<sub>2</sub> (Quadro 4).

Os resultados obtidos sugerem que a atmosfera de CO<sub>2</sub> tem vantagem em manter a cor verde, no amadurecimento verde da azeitona, o que é o desejável para o processamento de azeitonas verdes, mantendo as características e qualidades das azeitonas e tornando as azeitonas agradáveis a nível olfato-gustativo.

**Quadro 4-** Teores médios da composição fenólica total, orto-difenóis, antocianinas e carotenos nas azeitonas de mesa Negrinha do Freixo, submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação<sup>1</sup>.

Data de amostragem	Atmosfera	Fenólicos Totais (mg.g <sup>-1</sup> peso seco)	Orto-difenóis (mg.g <sup>-1</sup> peso seco)	Antocianinas (mg.g <sup>-1</sup> peso seco)	$\alpha$ -caroteno (%)	$\beta$ -caroteno (%)
11-10-2012	CO2	1,24 ± 0,17	0,89 ± 0,02	1,31 ± 0,18	1,16 ± 0,15	1,11 ± 0,14
11-10-2012	Normal	1,14 ± 0,02	1,18 ± 0,25	0,72 ± 0,17	1,54 ± 0,70	1,47 ± 0,68
05-11-2012	CO2	0,98 ± 0,001	0,82 ± 0,08	1,22 ± 0,22	1,02 ± 0,12	0,98 ± 0,11
05-11-2012	Normal	1,17 ± 0,15	1,17 ± 0,08	1,08 ± 0,04	0,65 ± 0,02	0,62 ± 0,02
09-11-2012	CO2	0,99 ± 0,07	0,86 ± 0,06	0,79 ± 0,28	1,12 ± 0,17	1,07 ± 0,16
09-11-2012	Normal	1,08 ± 0,02	1,07 ± 0,05	0,81 ± 0,23	0,75 ± 0,08	0,72 ± 0,08
28-11-2012	CO2	0,75 ± 0,15	0,77 ± 0,06	1,06 ± 0,27	1,33 ± 0,19	1,25 ± 0,18
28-11-2012	Normal	0,93 ± 0,17	0,97 ± 0,07	0,93 ± 0,33	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,02
Significância						
Data de amostragem (C)		**	n.s	n.s	n.s	n.s
Atmosfera (A)		n.s	*	n.s	n.s	n.s
C x A		n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

<sup>1</sup>Valores expressos como média ± erro padrão de três repetições e analisados estatisticamente para os níveis de significância n.s. (não significativo, p>0.05); \* (p<0,05); \*\* (p<0,01) e \*\*\* (p<0,001).

### 4.2.3-Composição fenólica individual

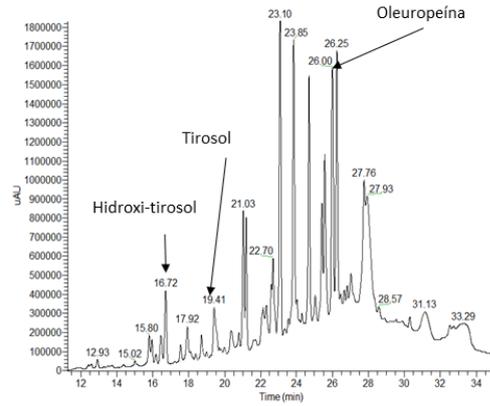
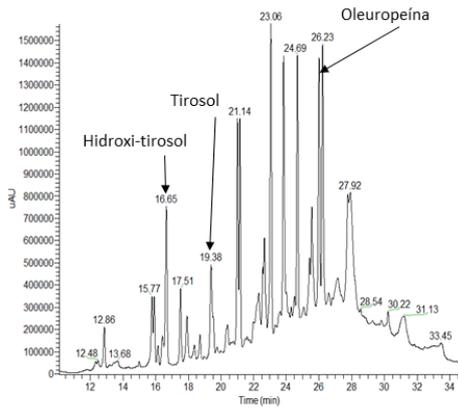
Relativamente à composição em compostos fenólicos individuais identificámos por HPLC-DAD em três comprimentos de onda diferentes (280, 320 e 370 nm) 8 diferentes compostos fenólicos, nomeadamente: Hidroxi-tirosol, tirosol e oleuropeína no comprimento de onda de 280 nm; ácido caféico e verbascoside a um comprimento de onda de 320 nm e no comprimento de onde de 370 nm os fenólicos rutina, luteolina-7-*O*-glucósido e a luteolina-4-*O*-glucósido (Figura 33). Estes resultados estão de acordo com Malik *et al.* (2006), Pereira *et al.* (2006) e Vinha *et al.* (2005) que também identificaram a oleuropeína, verbascoside, hidroxi-tirosol e tirosol como os principais compostos fenólicos presentes em azeitonas, ainda que os seus teores tenham sido diferentes. Quanto à quantificação dos compostos fenólicos individuais, revelou-se que as azeitonas conservadas em CO<sub>2</sub> e atmosfera normal apresentam o mesmo perfil cromatográfico apesar dos teores terem variado entre estes dois tipos de atmosfera.

De acordo com os cromatogramas obtidos, foi possível verificar que o perfil de compostos fenólicos foi semelhante em ambos os tipos de atmosfera (Figura 33), ainda que as concentrações de cada um dos fenólicos tenha sido ligeiramente diferente entre ambas atmosferas (Quadro 5).

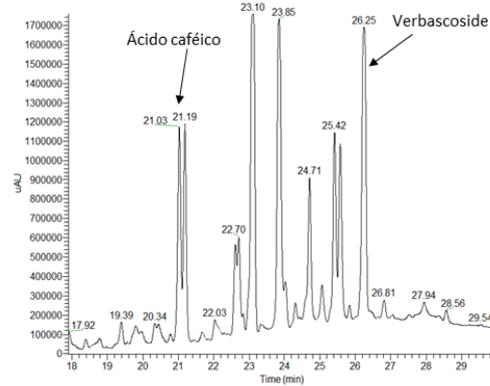
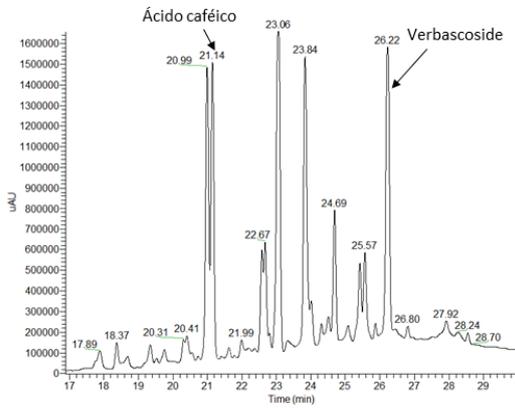
**Atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>**

**Atmosfera normal**

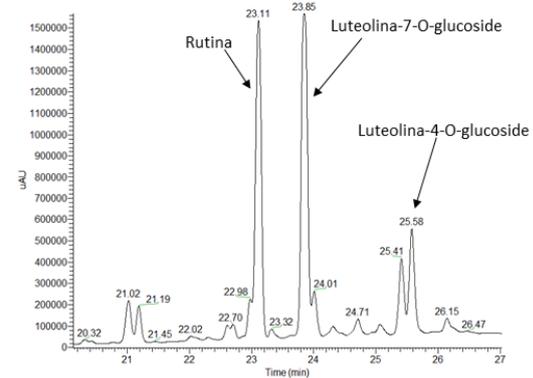
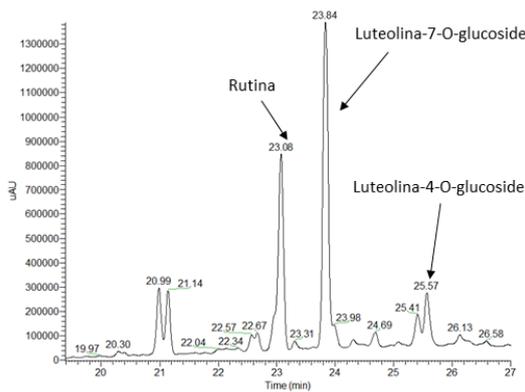
280 nm



320 nm



370 nm



**Figura 33**-Exemplo do perfil cromatográfico a 280, 320 e 370 nm, das azeitonas Negrinha do Freixo submetidas conservadas em atmosfera saturada com CO<sub>2</sub> e atmosfera normal, no início do ensaio.

De acordo com os resultados obtidos (Quadro 5), foi possível verificar que o tipo de atmosfera teve um efeito altamente significativo ( $P < 0,001$ ) na variação da concentração dos principais compostos fenólicos, com exceção do hidroxitirosol ( $P > 0,05$ ) e ácido caféico ( $P > 0,05$ ). Observamos que, entre o início e o final do ensaio houve uma maior redução de oleuropeína nas azeitonas conservadas a  $\text{CO}_2$  (Quadro 5), o que em certa medida vem confirmar a redução de amargor perceptível nas últimas provas da análise sensorial. No entanto a esta redução de oleuropeína não correspondeu um aumento de hidroxitirosol nem tirosol. Já relativamente às azeitonas mantidas na atmosfera normal, verificou-se que nestas aumentaram os teores em oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol, rutina, verbascoside e luteolina-7-*O*-glucósido. Se do ponto de vista biológico, estas azeitonas teriam mais interesse por terem um maior teor médio em compostos fenólicos individuais, já não terão interesse do ponto de vista organoléptico devido ao maior teor em oleuropeína que lhe confere um maior amargor, logo menor aceitação comercial.

Com base nestes resultados, conservar as azeitonas numa atmosfera saturada com  $\text{CO}_2$  tem vantagem em promover a diminuição do amargor, pela redução da concentração em oleuropeína. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Dourtoglou *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2006). No entanto, Dourtoglou *et al.* (2006) no seu estudo obteve uma diminuição da oleuropeína ao fim do décimo segundo dia de amostragem verificando-se uma redução do amargor e uma preservação das características organolépticas, enquanto neste trabalho a redução foi determinada apenas no final da amostragem.

Apesar desta diferença notamos que o tratamento realizado com  $\text{CO}_2$  teve um efeito na redução de oleuropeína, o que era pretendido.

**Quadro 5-** Teores médios da composição em fenólicos individuais das azeitonas de mesa Negrinha do Freixo, submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação<sup>1</sup>.

Data de amostragem	Atmosfera	Hidroxi-Tirosol	Tirosol	Ác. Caféico	Rutina	Verbascoside	Luteolina-7-O-glucósido	Luteolina- 4-O-glucósido	Oleuropeína
11-10-2012	CO2	1766,12±37,19	2388,79±23,86	1370,14±1,02	1292,29±95,09	3628,91±131,86	1402,05±61,19	284,67±12,15	1432,27±234,60
	Normal	1323,19±204,46	1604,93±78,03	1335,82±172,39	1272,09±6,64	3308,07±78,00	1988,40±44,12	449,01±28,35	3352,85±571,95
28-11-2012	CO2	634,56±0,94	1558,59±28,12	433,17±25,30	382,78±33,73	920,04±141,04	1562,87±175,64	265,96±20,08	1121,49±5,23
	Normal	1401,63±107,96	1901,83±75,64	728,03±119,29	1426,84±133,31	3651,13±329,99	2274,34±127,19	391,07±30,63	7681,37±364,16
Significância									
Data de amostragem (C)		**	**	n.s	**	**	n.s	n.s	**
Atmosfera (A)		n.s	**	*	***	***	***	***	***
C x A		n.s	**	n.s	***	***	n.s	n.s	***

<sup>1</sup>Valores expressos como média ± erro padrão de três repetições e analisados estatisticamente para os níveis de significância n.s. (não significativo, P>0.05); \* (P<0,05); \*\* (P<0,01) e \*\*\* (P<0,001).

### 4.3- Atividade antioxidante

Nesta secção do trabalho encontram-se expressos os resultados relativos ao potencial antioxidante dos extratos de azeitona pelos seguintes métodos: efeito bloqueador do radical livre DPPH, poder redutor e captura do radical livre ABTS+. Os resultados obtidos são apresentados no Quadro 6.

**Quadro 6-** Atividade antioxidante das azeitonas de mesa Negrinha do Freixo submetidas a dois tipos diferentes de atmosfera de conservação<sup>1</sup>.

Colheita	Atmosfera	DPPH (%)	Poder redutor (absorvância 700 nm)	ABTS (mg.mL <sup>-1</sup> equivalentes de Trolox)
Início do ensaio	CO2	66,98±0,48	2,07±0,03	0,12±0,0002
	Normal	65,34±1,27	2,11±0,01	0,12±0,0001
Fim do ensaio	CO2	73,05±2,17	2,18±0,01	0,12±0,0003
	Normal	53,71±3,71	2,18±0,02	0,12±0,0001
Significância				
Colheita (C)		n.s	n.s	n.s
Atmosfera (A)		n.s	n.s	n.s
C x A		*	n.s	n.s

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± erro padrão de três repetições e analisados estatisticamente para os níveis de significância n.s. (não significativo, p>0.05); \* (p<0,05); \*\* (p<0,01) e \*\*\* (p<0,001).

De acordo com os dados obtidos (Quadro 6), podemos verificar que o tipo de atmosfera de conservação não influenciou de forma categórica os teores médios da atividade antioxidante (AA). No entanto observamos que os valores obtidos de atividade antioxidante pelos métodos do poder redutor e ABTS foram elevados e que se mantiveram constantes no decorrer do trabalho. Ao contrário, a atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH, diminuiu ao longo do tempo e foi superior na atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>. Resultados semelhantes foram obtidos por Dourtoglou *et al.* (2006), que observaram menor atividade antioxidante em azeitonas conservadas em atmosfera normal, comparativamente a outras formas de conservação. Segundo os mesmos autores, esta tendência estará mais relacionada com a preservação de compostos bioativos em CO<sub>2</sub> entre os quais carotenos, clorofilas e alguns flavonóides como luteolinas. Situação análoga à observada no corrente estudo. Também os autores Clodoveo *et al.* (2007) obser-

varam que o armazenamento de azeitonas em atmosfera rica em CO<sub>2</sub> permite uma melhor conservação das suas características organolépticas e das suas propriedades funcionais, o que se confirma como neste estudo devido à maior preservação da atividade antioxidante nas azeitonas conservadas em CO<sub>2</sub>.

A diferença de tendência de resultados entre os diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante, poderá estar relacionada com o comportamento dos diferentes compostos presentes nas azeitonas. Segundo Brand-Williams *et al.* (1995), diferentes tipos de compostos têm diferentes tipos de cinética em presença dos radicais de DPPH. Segundo os mesmos autores, o método do DPPH será mais associado à variação de certos compostos fenólicos, como por exemplo ácido cafeico, ácido gálico e ácido ferúlico, todos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos. O que se parece confirmar neste estudo, pois amostras com uma maior redução de ácido caféico também exibiram uma menor atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Relativamente ao método do Poder redutor este está mais associado à variação conjunta dos fenólicos totais do que à variação de um qualquer fenólico individual como acontece com o método do DPPH (Odabasoglu *et al.*, 2005). Assim, porque de um modo geral os teores em fenólicos totais se mantiveram mais ou menos constantes entre atmosferas também os teores da atividade antioxidante determinada por este método pouco variaram, o que confirma a tendência reportada por Odabasoglu *et al.* (2005).

Já relativamente ao método do ABTS parece estar mais relacionado com a presença de pigmentos que para além de interferirem na cor dos extratos estão associados com a atividade antioxidante, como é o caso das clorofilas e carotenos (Brand-Williams *et al.*; 1995). Isto significa que amostras com elevados teores em pigmentos podem apresentar elevados teores médios de atividade antioxidante. Em certa medida foi o que aconteceu neste trabalho, já que ao haver pouca variação dos teores de carotenos, quer ao longo do período de amostragem quer entre atmosferas, a atividade antioxidante pelo método do ABTS manteve-se praticamente constante (Quadro 6).

Relativamente ao método do Poder redutor este está mais associado à variação conjunta dos fenólicos totais do que à variação de um qualquer fenólico individual como acontece com o método do DPPH (Odabasoglu *et al.*, 2005).

Assim, de acordo com estes resultados e com base em trabalhos realizados anteriormente por outros autores (Oliveira *et al.*, 2008; Malheiro *et al.*, 2011, 2012), parece-nos evidente que a maior atividade antioxidante das azeitonas em CO<sub>2</sub> pode ser justificada

pela menor redução em compostos bioativos, neste tipo de atmosfera. De facto, analisando as diferenças de teores em compostos bioativos, entre o início e o fim do ensaio, as azeitonas em CO<sub>2</sub> tiveram um menor redução de compostos fenólicos, antocianinas e carotenos, do que as amostras mantidas em atmosfera normal (Quadros 4 e 5). Assim, do ponto de vista das propriedades funcionais, conservar as azeitonas em CO<sub>2</sub> terá uma maior vantagem do que as conservar em atmosfera normal.

# **Capítulo 5**

## **Conclusão**



## 5.1- Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, de uma forma geral, conseguimos atingir os objetivos a que nos propusemos com a realização deste estudo. Verificou-se que foi possível observar que a atmosfera rica em CO<sub>2</sub> favoreceu a diminuição da oleuropeína, mantendo os teores de compostos bioativos e com isto a manutenção das suas propriedades benéficas como uma moderada a elevada atividade antioxidante. As características antioxidantes encontram-se em teores mais baixos nas azeitonas sujeitas a atmosfera normal do que na atmosfera rica em CO<sub>2</sub>, o que revela que as propriedades funcionais das azeitonas são conservadas na atmosfera com CO<sub>2</sub>.

A análise sensorial mostrou que nas azeitonas armazenadas em atmosfera de CO<sub>2</sub>, a diminuição de amargor foi detetada logo nos primeiros 20 dias. Por outro lado o índice de cor mostrou que a cor verde/amarelada manteve-se; as análises de textura indicaram que os frutos não perderam as características físicas, como rigidez e consistência.

Em relação aos compostos fenólicos e orto-difenóis verificamos que na última amostragem houve uma redução de 20% em ambos os parâmetros. No que respeita ao perfil fenólico e dando importância ao composto fenólico responsável pelo amargor das azeitona, ou seja, a oleuropeína observou-se na última data de amostragem o teor nas azeitonas deste fenólico 7 vezes superior na atmosfera normal em relação a atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>.

No que diz respeito ao valor biológico (por compostos bioativos) das azeitonas nos diferentes tratamentos constatamos que a atividade antioxidante foi superior nas azeitonas da atmosfera saturada em CO<sub>2</sub>, pode ser justificada pela menor redução em compostos bioativos, neste tipo de atmosfera, em consequência que os compostos fenólicos tiveram uma menor redução, assim como as antocianinas e os carotenos. Assim, do ponto de vista do valor biológico e nutricional a ingestão das azeitonas na dieta alimentar, cuja desamerização ocorreu em atmosfera saturada de CO<sub>2</sub> parece ser vantajoso.

E por último, o armazenamento em CO<sub>2</sub> permite reduzir o amargor natural das azeitonas sem o uso de substâncias químicas, com um impacto ambiental menor.

## 5.2- Considerações Futuras

Com base nos resultados preliminares deste trabalho sugerimos que seria oportuno dar continuidade a este tema, sobretudo devido à importância que a ingestão da azeitona de mesa assume cada vez mais no nosso País, por forma a termos dados mais conclusivos. Assim, achamos que seria apropriado: i) estudar outras cultivares destinadas a azeitona de mesa, pois estas poderão ter diferentes comportamentos face às mesmas condições de desamerização; ii) estender os ensaios por um período de tempo mais alargado; iii) comparar o efeito do CO<sub>2</sub> na desamerização com outros tipos de processamento para o mesmo fim, seja a nível industrial e também de forma tradicional, e conservação tradicional (por exemplo salmoura); iv) seria interessante aplicar este tipo de processamento na mesma cultivar mas não em sequeiro, como no presente trabalho, mas em azeitonas provenientes de oliveiras com diferentes estratégias de rega, dado que a rega diminui o teor em compostos fenólicos totais e o amargor; atualmente não faz sentido produzir azeitonas de mesa em sequeiro porque o peso e calibres dos frutos são menores.

## Referências Bibliográficas

- Alvarenga, N. (2000). Estudos em textura de Queijo Serpa. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Anniva, C. & Tsimidou, M.Z. (2009). On the quality control of “olive paste”, a specialty based on olives and olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**, 328–336.
- Aponte, M.; Ventorino, V.; Blaiotta, G.; Volpe, G.; Farina, V.; Avellone, G.; Lanza, C. M. & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, **27**, 162-170
- Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F. & Garrido-Fernández, A. (2010). Predictive microbiology and table olives. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 1452-1461. Vol. II, *Formatex Research Center, Badajoz*, Espanha. ISBN (13): 978-84-614-6195.
- Arroyo-López, F. N.; Querol, A.; Bautista-Gallego, J. & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 189–196.
- Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2001). *El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, 4ª Edição, Madrid (Espanha). ISBN: 84 – 7114 – 983 – 4.
- Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Barrio, E.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A. & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, **147**, 89–96.
- Ben Othman, N.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, P. & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, 662-669.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 229-242.

- Bisignano, G.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccelle, N. & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 971-974.
- Blekas, G.; Vassilakis, C.; Harizanis, C.; Tsimidou, M. & Boskou, D. G. (2002). Bio-phenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3688-3692.
- Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sánchez, A. H. & Garrido, A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2702-2706.
- Briante, R.; Patumi, M.; Febbraio, F. & Nucci, R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermo-philic  $\beta$ -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, **111**, 67-77.
- Cabezas, J. M. E. (2011). *La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades*. Fotomecánica e impresión: Imprenta tecé, Sevilla.
- Caderno de especificações da azeitona de Conserva Negrinha de Freixo, disponibilizado em [https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fagriculture%2Fquality%2Fdoor%2FdocumentDisplay.html%3FchkDocument%3D250\\_1\\_pt&ei=g-qFUszEKvy7AaavYDYDw&usg=AFQjCNFQNdXIx2zc34lL3aXKmp831A23Lg&sig2=rfTtkp-UEOickWlsfBw8uw&bvm=bv.56643336,d.ZGU](https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fagriculture%2Fquality%2Fdoor%2FdocumentDisplay.html%3FchkDocument%3D250_1_pt&ei=g-qFUszEKvy7AaavYDYDw&usg=AFQjCNFQNdXIx2zc34lL3aXKmp831A23Lg&sig2=rfTtkp-UEOickWlsfBw8uw&bvm=bv.56643336,d.ZGU). Acedido a 10 de Setembro.
- Cardoso, M. S.; Mafra, I.; Reis, A.; Nunes, C.; Saraiva, J. A. & Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *Food Science and Technology*, **43**, 153–160.
- Castro, A.; Brenes, M. (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, **36**, 797 - 802.
- Charoenprasert, S. & Mitchell, A. (2012). Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 7081-7095.

- Clodoveo, L.M, Delcuratolo D., Gomes T., Colelli G. (2007). Effect of different temperatures and storage atmospheres on Coratina olive oil quality. *Food chemistry* 102; 571-576
- Codex Alimentarius (2010). Proposed Draft Codex Standard for Table Olives (Revision of Codex Stan 66-1981). [http://www.cclac.org/documentos/CCPFV/2010/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/pf25\\_04e.pdf](http://www.cclac.org/documentos/CCPFV/2010/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/pf25_04e.pdf). Acedido a 27 de Março de 2014
- COI – Conselho Oleícola Internacional (1996). *Enciclopedia Mundial del Olivo*. Plaza & Janés Editores, S. A., 1ª Edição, Barcelona (Espanha). ISBN: 84-01-61877-0.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2004). Trade standard applying to table olives. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Acedido a 24 de Março de 2014.
- 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.
- Despacho Normativo nº 47/97. <http://dre.pt/pdf1sdip/1997/08/184B00/41624165.pdf>. Acedido a 2 de Abril de 2014.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric Food Chem.* 50, 3010-3014.
- Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 483–490. Ryan, M. & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31R-44R
- renes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J. J. & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,3535-3540.
- Dourtoglou, G. V, Mamalos, A, Makris P. D (2006). Storage of olives (*Olea europaea*) under CO2 atmosphere: Effect on anthocyanins, phenolics, sensory attributes and in vitro antioxidante properties. *Food chemistry* 99; 342-349
- Estatísticas Agrícolas (2012). Instituto Nacional de Estatística (2012). [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICA](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICA)

COESpub\_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2. Acedido a 4 de Abril de 2014.

- Esti, M.; Cinquanta, L. & La Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 32-35.
- Fernández, A. G.; Díez, M. J .F. & Adams, M. R. (1997). Table olives. Production and Processing. *Chapman & Hall*. London, UK.
- Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Soares, M. E.; Bastos, M. L. & Pereira, J. A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, **103**, 188-195.
- Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N. & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal Antimicrobial Agents* , **20**, 293-296.
- F. Peres, A. Ramos, C. Vitorino, C. Gouveia, S. Fereir-Dias & L. L. Martis (2012) Avaliação da maturação em azeitonas “Cobrançosa” e “ Galega Vulgar” com recurso a diferentes metodologias baseadas na cor dos frutos. Atas Portuguesas de Horticultura, nº **21**, 369-374
- Galanakis, C. M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 175-184.
- Garcia, B., Coelho, J., Costa, M., Pinto, J., and Paiva-Martins, F. (2012). A simple method for the drtermination of bioactive compounds in virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1727-1732.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, M. K.; Gilani, A. & Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 3291-3340.
- Gómez, A. H. S.; Garcia, P. G. & Navarro, L. R. (2006). Trends in table olive production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, 86-94.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58:966-968.

- Hammami, S. B. M.; Manrique, T. & Rapoport, H. F. (2011). Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae*, **130**, 445-451.
- Hurtado, A.; Reguant, C.; Esteve-Zarzoso, B.; Bordons, A.; Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Aberquina table olives. *Food Research International*, **41**, 738 - 744.
- Iland, P., Ewart, A., Sitters, J., Markides, A. and Bruer, N. (2000). Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, SA.
- Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J., and Coombe, B.G. (1996) Optimization of methods for the determination of total and red free glycosyl-glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*; 2: 171-178.
- Kailis S, & Harris D (2007). *Producing Table Olives*. Landlinks Press, Collingwood, Australia.
- Kanavouras, A.; Gazouli, M.; Leonidas, L. T.; Petrakis, C. (2005). Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, **56**, 106 - 115.
- Liu, Z., Lee, H.-J., Garofalo, F., Jenkins, D.J.A., and El-Sohemy, A. (2011). Simultaneous measurements of three tocopherols, all-trans-retinol, and eight carotenoids in Human plasma by isocratic liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 49:221-227.
- Mafra, I; Reis, A.; Coimbra, M. A. (2003). Efeito do processamento de azeitonas pretas oxidadas nos polissacarídeos das paredes celulares da polpa de azeitonas Douro. 6º Encontro de Química de Alimentos, Lisboa.
- Malheiro, R.; Sá, O.; Pereira, E.; Aguiar, C.; Baptista, P. & Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, **37**, 473– 478.
- Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A. & Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 449-456.

- Malik, N. S. A. & Bradford, J. M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, **110**, 274–278.
- Marsilio, V.; Campestre, C.; Lanza, B. (2001). Phenolic compounds during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55-60.
- Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C.; Garcia, A. & Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9817-9823.
- Montaño, A.; Sánchez, A. H.; Casado, F. J.; Castro, A. & Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, **82**, 297-302.
- Nogueira, F. (2012). Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos. *Dissertação para obtenção de grau de mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, pp-97.
- Nogueira, F., Mendes, P., Pereira, J.A., Pereira, E. L. (2012). Qualidade microbiológica de azeitonas de mesa provenientes de produtores artesanais de Trás-os-Montes. In VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012, *Atas Portuguesas de Horticultura*, nº 21, 335 - 340.
- Norma Portuguesa (NP) 3034. (2012). Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Nout, M. J. R. & Rombouts, F. M. (2000). Fermented and Acidified Plant Foods, in Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Nychas, G. J. E.; Panagou, M. L.; Waldron, K. W. & Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 173-177.

- Oliveira, I.; Sousa, A.; Morais, J. S.; Ferreira, I. C. F. R.; Bento, A.; Estevinho, L. & Pereira, J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 1801–1807.
- Ostrovidov, G.; Franck, P.; Joseph, D.; Martarello, L.; Kirsch, G.; Belleville, F.; Nabet, P. & Dousset, B. (2000). Screening of new antioxidant molecules using flowcytometry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 1762-1769.
- Othman, N. B.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, F.; Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, 662-669.
- Owen, R. W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 703-717.
- Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2000). Phenolics compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, **38**, 647-659.
- Panagou, E. Z. & Katsaboxakis, C. Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish method. *Food Microbiology*, **23**, 199-204.
- Panagou, E. Z.; Hondrodinou, O.; Mallouchos, A. & Nychas, G. J. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, **28**, 1301-1307.
- Panagou, E. Z.; Hondrodinou, O.; Mallouchos, A. & Nychas, G. J. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, **28**, 1301-1307.
- Panagou, E. Z.; Hondrodinou, O.; Mallouchos, A. & Nychas, G. J. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, **28**, 1301-1307.

- Panagou, E. Z.; Katsaboxakis, C. Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of Cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. *Food Microbiology*, **23**, 199-204.
- Panagou, E. Z.; Tassou, C. C. (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of Cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, **23**, 738-746.
- Panagou, E. Z.; Schillingerb, U.; Franz, C. M.A.P.; Nychas, G-J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **25**, 348 - 358.
- Parinos, C. S.; Stalikas, C. D.; Giannopoulos, T. S. & Pilidos, G. A. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, **145**, 339-343.
- Pereira, J. A.; Pereira, A. P. G.; Ferreira, I. C. F. R.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Seabra, R.; Estevinho, L. & Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8425–8431.
- Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G. e Almeida, A.P.S. (2010). Espessura da lâmina de cisalhamento na avaliação instrumental da textura da carne. *Ciência Rural, Santa Maria*, 40 (6): 1405-1410.
- Psani, M. & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 1329-1336.
- Regulamento CE nº 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17º do Regulamento (CEE) nº 2081/92 do Conselho.
- <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996R1107:PT:HTML>  
L. Acedido a 9 de Abril de 2014.

<http://eb1aldeiajoanes-fotos.blogspot.pt/2012/11/azeitonas-poema-numerico.html> Acedido a 2 Maio de 2014.

<http://guiaalimentacaosaudavel.blogspot.pt/2012/10/os-beneficios-das-azeitonas-e-do-azeite.html> Acedido a 2 Maio de 2014.

<http://jcoimbra.files.wordpress.com/2007/11/azeitona.jpg> Acedido a 2 Maio de 2014.

Regulamento CEE N° 2081/92 do Conselho. “Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior”. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2005:288:0005:0008:PT:PDF>. Acedido a 6 de Abril de 2014.

Rejano, L.; Montañó, A.; Casado, F. J.; Sánchez, A. H. & Castro, A. (2010). Table Olives: Varieties and Variations. *Food Biotechnology Department*, Instituto de la Grasa CSIC, Seville, Spain, **1**, 5-15.

Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J. L. & Fernández-Bolaños, J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-

Rodríguez-Gómez, F.; Bautista-Gallego, J.; Romero-Gil, V.; Arroyo-López, F. N.; Garrido-Fernández, A. & García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, **46**, 56-63.

Romeo, F.V.; Piscopo, A.; Mincione, A. & Poiana, M. (2012). Quality evaluation of different typical table olive preparations (cv Nocellara del Belice). *Grasas y aceites*, **63**, 19-25.

Romero, C.; Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; Garcia, A.; Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 479 - 484.

Romero, M. P.; Tovar, M. J.; Girona, J. & Motilva, M. J. (2002). Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. *Arbequina*) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5349-5354.

- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K. & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.. *Scientia Horticulturae*, **92**, 147-176.
- Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S. & Kallel, H. (2008).  $\alpha$ -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, **108**, 833-839.
- Satoh, E.; Tohyama, N. & Nishimura, M. (2005). Comparison of the antioxidant activity of roasted tea with green, oolong, and black teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **56**, 551-559.
- Savarese, M.; Marco, E. & Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* Cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105**, 761-770.
- Scott, J.K. (2001). Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. *In: Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components*. Eds. Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., and Sporns, P. John Wiley & Sons, Inc., UK. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F.2.2.1-F2.2.10.
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Coelho, A. V. & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, **12**, 385–396.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. Jr. (1965). *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144–158.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J. C. & Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013-1023.
- Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Malheiro, R.; Oliveira, M. B. P. P.; Pereira, J. A. (2011). Chemical Characterization of “Alcaparras” Stoned Table Olives from Northeast Portugal. *Molecules*, **16**, 9025-9040.
- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R. C.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. & Pereira, J. A. (2006). Phenolics and antimicrobial

activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 8533-8538.

Tassou, C. C.; Panagou, E. Z. & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, **19**, 605-615.

Therios, I (2009). Olives, Crop Science in Horticultura, CABI.

Tofalo, R.; Schirone, M.; Perpetuini, G.; Angelozzi, G.; Suzzi, G.; Corsetti, A. (2012). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie van Leeuwenhoek*, **102**, 121 - 131.

Uccella, N. (2001). Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trend in Food and Science & Technology*, **11**, 328-339.

Ünal, K. & Nergiz, C. (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, **54**, 71-76.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.; Mazur M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.

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

Yousfi K, Cert RM, Garcia JM. (2006). Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 117–124.



# **Anexos**



**Provedor**

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Género:**  F  M

**Amargor**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Ausência de amargo 1-Pouco perceptível - 2- Pouco amargo 3-Medianamente 4-Amargo 5- Muito Amargo

**Textura**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Muito Mole 1-Mole 2- Algo Mole 3- Medianamente 4- Mais Firme 5- Firme

**Doce**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-ausência de doce 1- Nada doce 2- Pouco doce 3- Medianamente 4- Mais Doce 5- Doce

**Frutado**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Ausência de frutado 1-Nada Frutado 2- Pouco Frutado 3-Medianamente 4- Mais Frutado 5- Frutado

**Verde**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Ausência de verde 1-Nada Verde 2- Pouco Verde 3- Medianamente 4- Mais Verde 5- Verde

**Cheiro**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Ausência de cheiro 1-Nada Azeitona 2- Pouco 3- Medianamente 4- Mais 5- Muito Azeitona

**Aparência**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Totalmente lisa 1-Nada enrugada 2- Pouco 3- Medianamente 4- Mais 5- Muito enrugada

**Cor**

0	1	2	3	4	5
---	---	---	---	---	---

0-Ausência de verde 1-Nada verde 2- Pouco 3- Medianamente 4- Mais 5- Muito verde

Penetrómetro: \_\_\_\_\_