

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado em Olivicultura e Azeite



**“Influência da luz nos parâmetros químicos de
qualidade em azeites monovarietais ”**

Dissertação de mestrado elaborada por:
Ana Idalina Rodrigues Ferreira

Orientadora:
Doutora Raquel Marta Neves dos Santos Garcia

Co-orientadora:
Doutora Maria João Pires Bastos Cabrita

ÉVORA, 2012

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado em Olivicultura e Azeite



**“Influência da luz nos parâmetros químicos de
qualidade em azeites monovarietais ”**

Dissertação de mestrado elaborada por:
Ana Idalina Rodrigues Ferreira

Orientadora:
Doutora Raquel Marta Neves dos Santos Garcia

Co-orientadora:
Doutora Maria João Pires Bastos Cabrita

ÉVORA, 2012

Ao meu sobrinho, João Francisco

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Doutora Raquel Marta Neves dos Santos Garcia, por todos os conhecimentos transmitidos, pela sua permanente disponibilidade na orientação e revisão deste trabalho, por todo o incentivo e apoio demonstrados.

À Professora Doutora Maria João Pires Bastos Cabrita, pela sua ajuda e colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha irmã Marta, por ser sempre a minha maior força, pelo seu apoio.

Ao meu irmão João, por todas as vezes que me ausentei, para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores do laboratório de Enologia, especialmente à Engenheira Antónia Prates Oliveira, pela sua permanente boa disposição, pela ajuda e carinho.

A todos os que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, me incentivaram e ajudaram, o meu muito obrigada.

RESUMO

O azeite é o principal componente da dieta mediterrânea. O seu consumo tem vindo a aumentar, como consequência dos seus efeitos benéficos para a saúde. A qualidade do azeite virgem pode diminuir ao longo do tempo devido à degradação oxidativa / hidrolítica, influenciadas pela luz e temperatura. A preocupação em garantir a qualidade do azeite durante o tempo que decorre desde a produção até ao engarrafamento e comercialização é cada vez mais importante. Assim, as condições de armazenamento são fatores determinantes para a qualidade do azeite.

O objetivo do presente trabalho foi estudar como o armazenamento do azeite em presença de luz influencia os parâmetros químicos da qualidade. Analisaram-se três variedades de azeite, Arbequina, Cobrançosa e Picual, armazenadas por um período de oito meses em presença de luz e no escuro, e realizaram-se várias determinações analíticas tais como: acidez, índice de peróxidos, índice espectrofotométrico, polifenóis totais, tocoferóis e ácidos gordos.

“Influence of light on quality chemical parameters of monovarietal olive oils”

ABSTRACT

Olive oil is the main component of the Mediterranean diet. Its use has increased as a result of its beneficial effects on health. The quality of virgin olive oil decreases over time due to oxidative degradation / hydrolytic influenced by light and temperature. Thus, it is of great relevance to ensure the olive oil quality during the time from production to bottling and marketing. Therefore, the storage conditions are considered key factors for the olive oil quality.

The aim of this work was to study how the storage of olive oil in the presence of light influences the chemical quality. We analyzed three different varieties of olive oil, Arbequina, Cobrançosa and Picual, stored for a period of eight months in the presence of light and dark, and several analytical determinations were performed, such as acidity, peroxide value, spectrophotometric index, total polyphenols , tocopherols, and fatty acids.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS	vii
TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO:.....	viii
COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O Azeite	3
2.1.1. Composição química do azeite.....	3
2.1.1.1. Fração saponificável.....	5
2.1.1.1.1- Ácidos gordos	5
2.1.1.1.2- Triacilgliceróis	7
2.1.1.1.3- Fosfolípidos.....	8
2.1.1.2. Fração insaponificável.....	8
2.1.2. Qualidade do azeite	18
2.1.3. Reações de degradação do azeite	22
2.1.4. Condições de armazenamento do azeite.....	24
2.1.4.1. Influência da luz	26
2.1.5. As variedades Arbequina, Cobrançosa e Picual	27
2.1.5.1. Arbequina	27
2.1.5.2. Cobrançosa	28
2.1.5.3. Picual	28
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.1. Métodos analíticos	29
3.1.1. Acidez	29
3.1.2. Polifenóis totais	30
3.1.3. Índice de peróxidos	31
3.1.4. Índices espectrofotométricos.....	32
3.1.5. Ésteres metílicos dos ácidos gordos	33
3.1.6. Tocoferóis.....	35
3.2. Análise estatística de resultados	37
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	38
4.1. Acidez	38

4.2. Polifenóis totais	39
4.3. Índice de peróxidos	40
4.4. Índices espectrofotométricos.....	44
4.5. Ésteres metílicos dos ácidos gordos	48
4.6. Tocoferóis	52
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ABREVIATURAS

COI - Conselho Oleícola Internacional

GC - Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

ID - diâmetro interno (internal diameter)

IP - índice de peróxidos

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados (Monounsaturated fatty acids)

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados (Polyunsaturated fatty acids)

PI - padrão interno

DESIGNAÇÕES ANGLO-SAXÓNICAS:

DAD - detector de diódos (diode-array detector)

Liner - Peça de vidro de formato cilíndrico, aberto nas duas extremidades, colocada no interior do sistema cromatográfico.

Split - Termo usado para designar a divisão do fluxo gasoso durante a injeção num sistema de cromatografia gasosa.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO:

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

1. Ana Ferreira, Maria João Cabrita, Ana Maria Costa Freitas and Raquel Garcia, "Effect of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage", 36th International Symposium on Capillary Chromatography, 27 Maio- 1 Junho, 2012, Riva del Garda, Itália.

2. Ana Ferreira, Nuno Martins, Maria João Cabrita, Raquel Garcia, "Influência da exposição à luz durante o armazenamento em azeites extra virgem nos parâmetros da qualidade", 11^o Encontro Química dos Alimentos, 16 - 19 Setembro, 2012, Bragança, Portugal.

1. INTRODUÇÃO

O azeite, óleo resultante da azeitona, fruto da oliveira (*Olea Europea L.*) é usado na gastronomia desde a antiguidade, sendo um dos principais constituintes da dieta mediterrânea, apresentando um elevado interesse socio-económico. Foi, desde sempre, extraído exclusivamente por processos mecânicos, conservando assim o sabor, o aroma e todas as propriedades do fruto do qual tem origem, pelo que possui características organoléticas particulares, com uma composição química única, ocupando assim, uma posição privilegiada relativamente a outros óleos e gorduras vegetais.

A sua importância ao longo dos tempos resultou das múltiplas utilizações que lhe foram dadas: na alimentação, medicina, produto de beleza, combustível para iluminação, lubrificante para as ferramentas e alfaias agrícolas, impermeabilizante para as fibras têxteis e elemento essencial em ritos religiosos (Gouveia, 2002).

Mais recentemente, o seu consumo tem vindo a alargar-se a outras regiões para além dos países mediterrânicos. Para esta expansão têm contribuído de forma muito significativa as intrínsecas propriedades nutricionais que este tipo de produto apresenta, nomeadamente a presença de ácidos gordos monoinsaturados, cuja ingestão favorece o sistema cardiovascular na medida em que permite controlar os níveis de colesterol no sangue pois equilibra o “mau” colesterol (LDL) e aumenta o teor de lipoproteínas de alta densidade, o “bom” colesterol (HDL), ação antioxidante, anti-inflamatória e anticoagulante.

O azeite extra virgem é considerado o melhor azeite devido às suas características organoléticas, estabilidade oxidativa e composição química, sendo o único óleo vegetal que pode ser consumido diretamente em cru e contém elementos nutricionais importantes, entre os quais se destacam as vitaminas e os antioxidantes (Baccouri *et al*, 2008).

No que respeita às características organoléticas, o azeite apresenta sabores e aromas únicos que advêm da sua complexa composição química, sendo de destacar inúmeros compostos químicos pertencentes às classes dos compostos fenólicos e voláteis.

Apesar de ser usado na culinária desde há séculos, o azeite tem sido, mais recentemente, alvo de uma intensa investigação científica com vista a determinar informação mais precisa acerca dos benefícios deste alimento para a saúde humana (Boskou, 2007).

Os estudos científicos desenvolvidos têm incidido em aspetos muito diversos, dos quais se destacam: a composição química e a sua relação com os efeitos benéficos para a saúde associados à ingestão deste produto, assim como, a definição de parâmetros que permitam assegurar a qualidade e autenticidade deste produto de elevado valor económico. Em particular, a qualidade do azeite pode ser influenciada por diversos fatores que vão desde a qualidade da matéria-prima utilizada para a sua produção (azeitonas), o tipo de processo para a sua obtenção até às condições de embalagem e armazenamento. A inadequabilidade de algum procedimento ao longo destas fases pode comprometer irremediavelmente a qualidade final do azeite, podendo tornar inviável a sua comercialização.

O consumidor é cada vez mais exigente com a qualidade dos produtos alimentares e com a durabilidade dos mesmos até ao ato de consumo. Estas expectativas têm como consequência a obrigatoriedade da implementação de requisitos que conduzem não só à obtenção de produtos seguros mas também com mínimo de resistência às alterações desvantajosas da qualidade sensorial (Morelló *et al.*, 2004)

Assim, é no contexto da qualidade química do azeite e, mais concretamente, no efeito das condições de armazenamento a que este se pode encontrar sujeito, que surge o presente trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado. Deste modo, o estudo desenvolvido visou investigar de que forma o armazenamento do azeite em presença da luz influencia os parâmetros químicos da qualidade. Para o presente estudo foram utilizados azeites monovarietais de diferentes variedades, nomeadamente Arbequina, Cobrançosa e Picual, com o objetivo de estender este estudo e, de inferir, se a variedade utilizada para a produção do azeite apresenta um efeito significativo na estabilidade oxidativa dos diferentes azeites em análise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Azeite

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2008), o azeite consiste no óleo obtido unicamente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), com exclusão dos óleos obtidos através do uso de solventes ou de processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza. O azeite é muito apreciado na dieta alimentar, particularmente na dieta mediterrânica, devido ao facto de possuir características específicas que o distinguem de outras gorduras vegetais. Este produto é a única gordura extraída por processos meramente mecânicos e que pode ser consumida diretamente, ao contrário de outros óleos vegetais que necessitam de sofrer ação de produtos químicos antes de serem consumidos (Saldanha, 1999).

Os azeites virgens são extraídos do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.) por procedimentos exclusivamente mecânicos e em condições térmicas que não produzam alterações químicas no azeite, não devendo ser submetido posteriormente a outras manipulações que não seja a sedimentação, decantação, centrifugação ou filtração (Ruiz *et al*, 1999).

Segundo Kiritsakis (1993), o azeite é o único de todos os óleos vegetais que pode ser consumido no estado virgem, sem qualquer processo de refinação, conservando todas as suas vitaminas e outros constituintes vegetais importantes. Quando processado a partir de frutos maduros frescos e de boa qualidade, o seu aroma é incomparável.

2.1.1. Composição química do azeite

O azeite é considerado um produto que possui vastas propriedades nutricionais as quais se encontram intimamente relacionadas com a sua complexa composição química. É de salientar que os fatores agronómicos, tais como a rega, a fertilização, a poda, as práticas agrícolas relacionadas com a produção, a colheita, o transporte e o armazenamento da azeitona, assim como, os fatores geográficos e climáticos, a variedade e o estado de maturação da azeitona podem ter uma influência bastante significativa na composição química do azeite. Outros fatores que poderão ainda provocar alterações na composição química do azeite são os que se encontram relacionados com a obtenção deste produto,

tais como o método de extração utilizado e o tipo de equipamentos, assim como, as condições de armazenamento e transporte (Dias, 2009).

Quimicamente, os componentes do azeite podem dividir-se, em duas frações, uma saponificável, a qual permite a formação de sabões (sais de sódio e/ou potássio) por hidrólise em meio alcalino e, outra, insaponificável. A fração saponificável constitui cerca de 97 a 99% do peso total do azeite, sendo composta maioritariamente por triacilgliceróis e uma pequena fração de di e mono gliceróis, fosfolípidos e de ácidos gordos livres, os quais são responsáveis pela acidez do azeite. A fração insaponificável é solúvel em água e representa cerca de 2% da massa total de azeite sendo composta por um conjunto muito variado de substâncias tais como ceras, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis, compostos voláteis e aromáticos. Apesar de constituírem a fração minoritária no azeite, a presença destas substâncias tem elevada importância, tanto do ponto de vista nutricional como em aspetos relacionados com a estabilidade e a qualidade organoléptica do produto final. Dada a sua elevada especificidade, os componentes minoritários são muitas vezes usados como critério de qualidade e de autenticidade [Boskou, 1998; Garcia *et al.*, 2005].

A riqueza nutricional do azeite tem sido alvo de detalhados estudos por parte da comunidade científica que se dedica a esta área do conhecimento. Sob o ponto de vista nutricional, estes estudos têm vindo a permitir a obtenção de um maior conhecimento sobre a composição química do azeite e a sua relação com as propriedades biológicas que este produto apresenta. Em particular, é de salientar o relevante papel desempenhado pelos ácidos gordos monoinsaturados os quais ajudam a baixar os níveis plasmáticos de LDL-colesterol (“Low-density lipoprotein”) e a elevar os níveis correspondentes de HDL-colesterol (“High-density lipoprotein”), o que favorece o sistema cardiovascular. Outras substâncias também presentes no azeite, tais como a vitamina E e os polifenóis desempenham um papel crucial na função antioxidante. Além da função antioxidante, os polifenóis apresentam também uma ação anti-inflamatória e anticoagulante, prevenindo o aparecimento do cancro do colón e da osteoporose (Cunha, 2007).

Nas secções seguintes será discutida em detalhe a composição química da fração saponificável e insaponificável do azeite e de que forma os componentes dessas frações

se encontram relacionados com alguns dos parâmetros da qualidade que serão objeto de estudo no âmbito do presente trabalho.

2.1.1.1. Fração saponificável

2.1.1.1.1- Ácidos gordos

Como referido anteriormente, a fração saponificável engloba os ácidos gordos livres. A composição em ácidos gordos é um dos parâmetros mais utilizados no controlo de qualidade de azeites. Estes compostos alifáticos caracterizam-se por apresentarem uma cadeia hidrocarbonada, saturada ou insaturada, com um grupo carboxílico numa das extremidades (Fig.1), podendo ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na sua estrutura química, de acordo com o seguinte critério:

- Ácidos gordos de cadeia curta (4-6 carbonos);
- Ácidos gordos de cadeia média (8-12 carbonos);
- Ácidos gordos de cadeia longa (14-18 carbonos);
- Ácidos gordos de cadeia muito longa (mais de 20 carbonos).

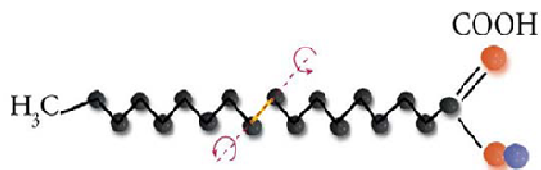


Figura 1- Representação esquemática do ácido esteárico (C17:0).

Contudo, atendendo ao grau de saturação os ácidos gordos podem ser ainda classificados em:

- Ácidos gordos saturados: cadeia hidrocarbonada sem ligações duplas;
- Ácidos gordos monoinsaturados (MUFA): cadeia hidrocarbonada com uma ligação dupla;
- Ácidos gordos polinsaturados (PUFA): cadeia hidrocarbonada com duas ou mais ligações duplas.

Na figura 2 encontra-se uma representação esquemática da classificação dos ácidos gordos de acordo com o grau de saturação da cadeia hidrocarbonada, com exemplos de alguns dos ácidos gordos que entram na composição química dos azeites. Para cada umas das classes é ainda indicado na figura 2 as respectivas gamas de percentagens em que podem estar presentes no azeite.

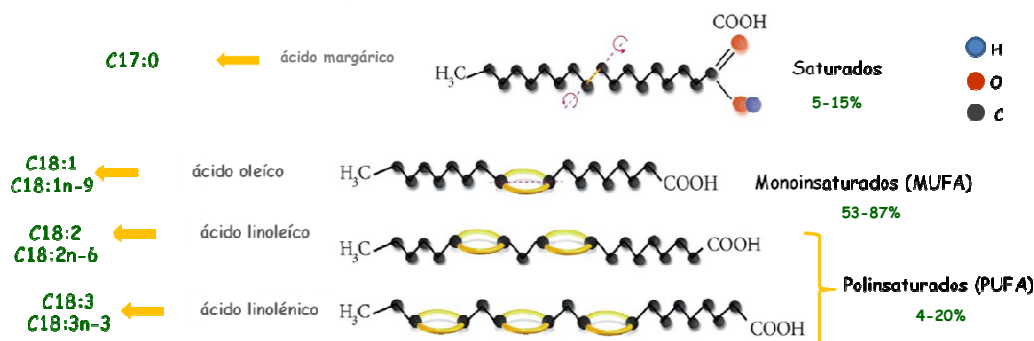


Figura 2- Classificação dos ácidos gordos atendendo ao grau de saturação da cadeia hidrocarbonada.

Encontra-se ainda indicada na figura 2, a nomenclatura dos diversos ácidos sob a forma de uma designação abreviada Cx:y, onde o x representa o número de átomos de carbono da cadeia hidrocarbonada e y representa o número de ligações duplas presentes na estrutura do ácido gordo. Esta designação pode ser ainda mais informativa se for indicada na forma Cx:y-z, em que z representa a posição da dupla ligação contada a partir da extremidade metilo (-CH₃).

É de salientar que, na natureza existe uma grande diversidade de ácidos gordos devido ao elevado número de possibilidades no que respeita ao número total de átomos de carbono, grau de insaturação, geometria e posição das ligações duplas, ocorrência de substituintes e respetivas posições na cadeia carbonada.

Nos azeites, o ácido gordo maioritário é o ácido oleico (C18:1n-9), que representa 53 a 83% dos ácidos gordos totais. Seguem-se-lhe os ácidos gordos saturados que, no seu conjunto, representam 13 a 21% dos ácidos gordos totais. Destes, o mais representativo é o ácido palmítico (C16:0) cuja presença no azeite varia entre 7,5 e 20% do teor total de ácidos gordos. Em menor proporção encontra-se o ácido palmitoleico (C16:1), com valores que oscilam entre 0,5 e 5% dos ácidos gordos totais. Por último, as quantidades

mais baixas de ácidos gordos saturados correspondem aos ácidos araquídico (C20:0) e behénico (C22:0) com um máximo de 0,8%, ao ácido heptadecanoico (C17:0) com valores até 0,5%, ao ácido mirístico (C14:0) com um máximo de 0,1% e ao ácido lignocérico (C24:0) com um máximo de 1%. No que se refere aos ácidos gordos polinsaturados, são representados principalmente pelo ácido linoleico (C18:2n-6), que representa 3,5 a 21% dos ácidos gordos totais, e pelo ácido linolénico (C18:3n-3), com um máximo de 1,5% (Codex STAN 33, 2003).

Recentemente foram estabelecidos limites para a composição em ácidos gordos no azeite, os quais se encontram sumarizados na tabela 1 (adaptado, COI 2008).

Tabela 1- Limites impostos para a composição em ácidos gordos no azeite (adaptado, COI 2008).

Ácidos Gordos (AG)	Limite (% do total de AG)
Mirístico	≤ 0,05
Palmítico	7,5 - 20
Palmitoleico	0,3 - 3,5
Heptadecanóico	≤ 0,03
Esteárico	0,5 - 5,0
Oleico	55,0 - 83,0
Linoleico	3,5 - 21
Linolénico	≤ 1,0
Araquídico	≤ 0,6
Eicosenóico	≤ 0,4
Behénico	≤ 0,2
Lignocérico	≤ 0,2

2.1.1.1.2- Triacilgliceróis

Os ácidos gordos estão presentes no azeite maioritariamente na forma de triacilgliceróis que são substâncias com elevado teor energético e, que por essa razão, atuam como reserva energética. Do ponto de vista químico, os triacilgliceróis consistem em três ácidos gordos esterificados com uma molécula de glicerol.

De uma forma geral, os triacilgliceróis que se encontram presentes no azeite em quantidades significativas são: 1,2,3-trioleoilglicerol-OOO (40-59%), rac-1,2-dioleoil-3-palmitoilglicerol-OOP (12-20%), rac-1,2-dilinoleoil-3-oleoilglicerol-LLO (12,5-20%), 1-palmitoil-2-oleoil-3-linoleoilglicerol-POL (5,5-7%) e rac-1,2-dioleoil-3-

Apesar dos componentes desta fração se encontrarem presentes em quantidades consideradas vestigiais são responsáveis pelo elevado valor biológico e nutricional do azeite assim como pelas suas características organolépticas e pela sua resistência à oxidação. Alguns destes compostos são considerados muito importantes ao nível do controlo de qualidade do azeite.

Ceras

Estes compostos derivam da esterificação de álcoois gordos com ácidos gordos e caracterizam-se por serem lipossolúveis a altas temperaturas e por recrystalizarem quando submetidos a temperaturas baixas. A sua presença pode contribuir para o aparecimento de turbidez no azeite quando este é arrefecido. As principais ceras detetadas no azeite são ésteres em C-36, C-38, C-40, C-42, C-44 e C-46 (Boskou, 1998). Segundo o Regulamento CE N° 702/2007, a concentração em cera no azeite não deverá ultrapassar 350 mg/Kg azeite. Contudo, o limite máximo de teor em ceras decresce para 250 mg/Kg nos azeites virgem extra.

Álcoois alifáticos e diterpénicos

Os principais álcoois alifáticos presentes nos azeites são: docosanol, tetracosanol, hexacosanol e octacosanol. Podem ainda encontrar-se outros álcoois, tais como o tricosanol, o pentacosanol e o heptacosanol embora estejam presentes em quantidades vestigiais (Boskou, 1998).

Os álcoois terpénicos identificados no azeite foram o eritrodiol e o uvaol, cujas estruturas químicas se encontram representadas na figura 4. Em termos quantitativos, o teor total destes dois compostos deverá ser inferior a 4,5% do total de esteróis (COI 2008).

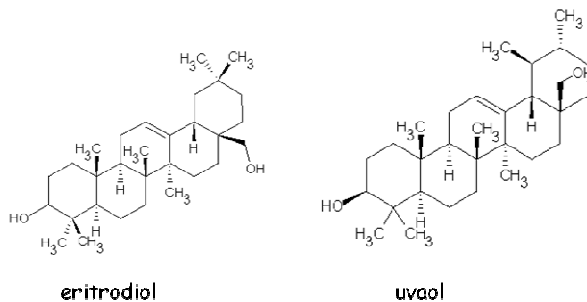


Figura 4- Principais álcoois terpénicos existentes no azeite.

Relativamente aos álcoois diterpénicos, os compostos mais abundantes no azeite pertencente a esta classe são o fitol e geranilgeraniol.

Hidrocarbonetos

Outro grupo de compostos que constituem a fração insaponificável do azeite são os hidrocarbonetos, os quais representam 32 - 50% desta matéria. De entre os hidrocarbonetos presentes, o esqualeno (Fig. 5) apresenta um teor bastante significativo podendo ser considerado o principal constituinte da matéria insaponificável. Este composto é o produto intermédio da biossíntese dos esteróis e precursor dos triterpenos e dos fitosteróis (Boskou, 1998).

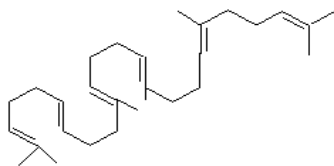


Figura 5- Estrutura química do esqualeno.

Clorofilas e carotenóides

Na classe dos pigmentos, as clorofilas a e b e as feofitinas a e b são responsáveis pela coloração que o azeite apresenta, sendo que a feofitina a é o pigmento predominante representando, nalguns azeites, 70 - 80% do total desta classe de compostos. Relativamente aos seus teores nos azeites, estes encontram-se compreendidos no intervalo de 1 a 20 µg/g.

Os principais carotenóides dos azeites são a luteína e o β -caroteno, podendo ainda encontrar-se a violaxantina e a neoxantina (Fig. 6). A luteína é considerada a componente maioritária da fração carotenóide do azeite. O teor destes compostos depende de diversos fatores, nomeadamente das características ecológicas da cultura e do manuseamento da azeitona, desde a apanha até à obtenção do azeite (Boskou, 1998; Maia, 2007).

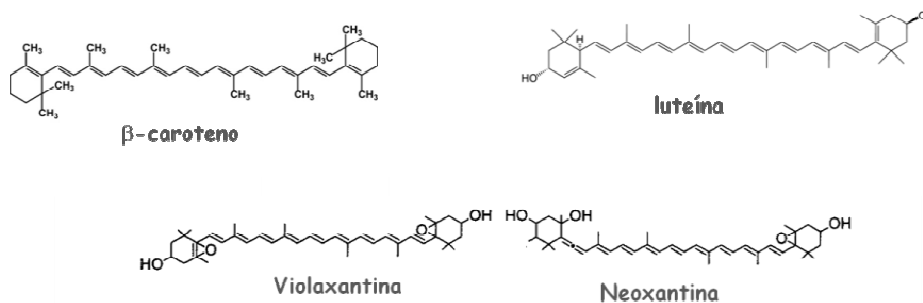


Figura 6- Principais carotenóides presentes no azeite.

Compostos fenólicos

Os compostos que pertencem à classe dos compostos fenólicos apresentam uma estrutura aromática cuja unidade básica é o fenol. Nesta vasta família encontram-se incluídas diversas classes de compostos, das quais se destacam: os ácidos e álcoois fenólicos, os secoiridoídes e seus derivados, os lignanos e os flavonóides, como ilustrado na figura 7 (Boskou, 2009).

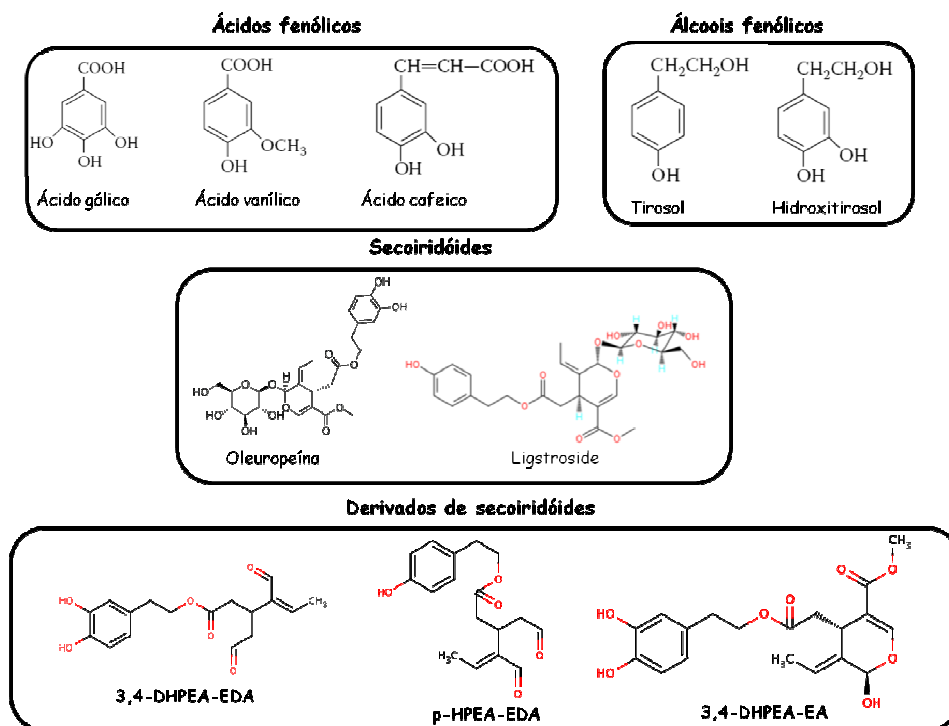


Figura 7- Alguns exemplos de compostos fenólicos presentes no azeite.

De entre as substâncias fenólicas identificadas no azeite virgem destacam-se os ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cumárico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cinâmico e ácido elenólico), os álcoois fenólicos (tirosol e hidroxitirosol), os secoiridóides (oleuropeína e ligstroside) e os seus derivados resultantes da sua hidrólise durante o esmagamento da azeitona (3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA), como esquematizado na figura 7.

Em termos organoléticos, os compostos fenólicos contribuem para o sabor, aroma e cor dos alimentos vegetais. A concentração em compostos fenólicos no azeite varia entre 50 a 1000 mg/Kg, sendo os valores usuais se situam entre 100 e 300 mg/Kg (expressos em ácido cafeico). Contudo, a fração fenólica do azeite apresenta um certo carácter heterogéneo sendo que esta é influenciada por diversos fatores, nomeadamente a variedade, as condições geográficas, as práticas agrícolas, a maturação da azeitona aquando da colheita assim como outros processos envolvidos na produção do azeite, tais como o tipo de moenda e as condições de armazenamento (Boskou, 1998).

Fitosteróis

Os esteróis vegetais designados por fitoesteróis são álcoois gordos, neutros e cíclicos, apresentam um carácter lipofílico e um grupo hidroxilo na posição C3 e derivam do núcleo fundamental do ciclopentanoperidrofenantreno ($C_{17}H_{28}$), como ilustrado na figura 8.

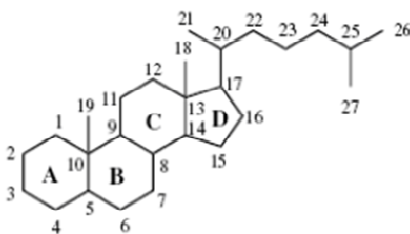


Figura 8- Estrutura molecular geral dos esteróis.

Os diversos fitosteróis da natureza diferem no número e posições das duplas ligações e na natureza da cadeia lateral.

No azeite, os principais fitosteróis são o β -sitosterol, o Δ^5 -avenasterol e o campesterol (Fig. 9). Em pequenas quantidades podem ainda encontrar-se o colesterol, o estigmasterol, o clerosterol, o Δ^7 -estigmasterol, o Δ^7 -avenasterol, o β -sitostanol, o Δ^7 -campesterol, o $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, o $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol e o 24-metil-colesterol (Boskou, 1998).



Figura 9- Principais fitosteróis presentes no azeite.

Estudos realizados sobre a composição química da fração esterólica revelaram que o β -sitosterol representa cerca de 75 a 90% da fração total de esteróis presentes no azeite enquanto o Δ^5 -avenasterol pode variar entre 5 e 20% e o campesterol pode oscilar entre 1 e 4% (Boskou, 1998).

De acordo com o COI, o teor total de esteróis deve ser superior a 1000 mg/Kg de azeite. No entanto, existem limites estabelecidos para cada um dos componentes da fração esterólica, como indicado na tabela 2.

Tabela 2- Limites impostos para os diversos compostos que constituem a fração esterólica.

Esteróis	Limites (% do total de esteróis)
Colesterol	$\leq 0,5$
Brassicasterol	$\leq 0,1^*$
Campesterol	$\leq 4,0$
Estigmaesterol	$< \text{Campesterol}$
Δ -7-estigmastenol	$\leq 0,5$
β -sitosterol + Δ -5-avenasterol + Δ -5,23-estigmastadienol + Clerosterol + Sitostanol + Δ -5,24-estigmastadienol	$\geq 93,0$

* O limite aumenta para 0,2% no caso dos óleos de bagaço de azeitona.

Tal como referido para outros componentes minoritários, o teor de fitosteróis no azeite constitui uma ferramenta útil na avaliação da qualidade e da autenticidade deste produto (Montealegre *et al.*, 2010).

Tocoferóis e tocotrienóis

Os tocoferóis constituem outra das classes de componentes minoritários que, apesar de estarem presentes em quantidades vestigiais, estudos recentes revelaram o seu importante papel biológico como antioxidantes. Esta propriedade biológica encontra-se diretamente relacionada com a estabilidade dos azeites. Os tocoferóis e tocotrienóis podem ser considerados como precursores da vitamina E. Em termos estruturais, os tocotrienóis distinguem-se dos tocoferóis pela presença de três insaturações na cadeia

lateral. Para estes compostos é possível a ocorrência de diversos isómeros devido à presença de 3 centros quirais na sua cadeia lateral. Assim, na natureza existem quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, em ambos os casos designados por α -, β -, γ - e δ -, os quais diferem entre si pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático, como representado na figura 10 (Boskou, 2009).

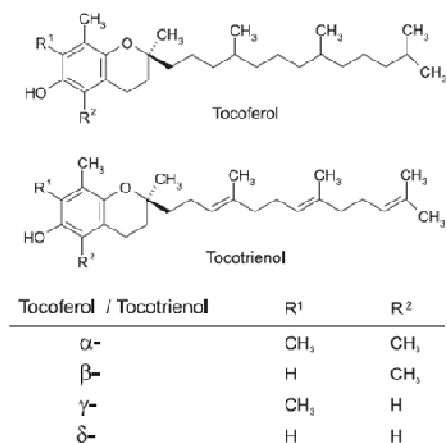


Figura 10- Estruturas químicas dos isómeros do tocoferol e tocotrienol existentes na natureza.

Em termos quantitativos, no azeite o α -tocoferol representa aproximadamente 90-95% do teor de tocoferóis totais; os isómeros β -, γ - encontram-se abaixo dos 10%; e o isómero δ - em proporções ainda mais baixas. Relativamente aos tocotrienóis, no azeite são raros os estudos que revelaram a presença destes compostos na composição química deste produto (Boskou, 2009).

O facto do teor de tocoferóis variar com a variedade e com a localização geográfica das azeitonas justifica o facto de diversos estudos apresentarem uma ampla gama de concentrações para este tipo de compostos.

A título exemplificativo, um estudo realizado em Portugal com azeites monovarietais (Cvs. Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana), obtidos de azeitonas em diferentes estados de maturação, revelou concentrações de tocoferóis totais (somatório dos valores de α -, β -, γ - tocoferóis) de 205, 163 e 131 $\mu\text{g/g}$, respetivamente (Pereira *et al.*, 2002).

A determinação do teor de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de azeite é sugerido por alguns autores como sendo um parâmetro importante para detetar a eventual adulteração do azeite com óleos vegetais (Frankel 2010; Chen *et al.*, 2011).

Compostos voláteis

A presença de compostos voláteis no azeite é influenciada por diversos fatores, dos quais se destacam: os fatores geográficos, a variedade da azeitona e o seu grau de maturação aquando da colheita, assim como o método e as condições de processamento do azeite (Aparício e Harwood, 2000; Kalua *et al.*, 2007).

Os compostos voláteis são percecionados pelo consumidor pois, dada a sua relativa volatilidade à temperatura ambiente, quando estes chegam ao epitélio olfactivo ligam-se aos receptores olfactivos originando a sensação aromática (Kalua *et al.*, 2007).

O aroma do azeite advém da presença de uma enorme variedade de compostos químicos, nomeadamente aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, hidrocarbonetos e furanos. Esses aromas poderão ser positivos, denominados como agradáveis, ou negativos designados vulgarmente por defeitos. A intervenção das enzimas endógenas das plantas, nomeadamente a lipoxigenase, é responsável pelos aromas positivos percecionados. Por outro lado, a oxidação química assim como as enzimas exógenas, normalmente provenientes da atividade microbiana são responsáveis pelos defeitos sensoriais (Kalua *et al.*, 2007).

Apesar de os compostos voláteis, quando estão presentes em concentrações abaixo do seu limite de perceção olfativa, não contribuírem diretamente para o aroma, a compreensão dos processos envolvidos na formação e decomposição dos compostos voláteis importantes para o aroma poderá tornar-se útil na avaliação da qualidade. Contudo, é de salientar que os compostos voláteis que se encontram presentes em concentrações mais elevadas poderão não ser os que representam uma maior contribuição para o aroma do azeite (Kalua *et al.*, 2007).

No que diz respeito à formação dos compostos voláteis, estas substâncias não são formadas em quantidades apreciáveis durante a fase de crescimento da azeitona surgindo, posteriormente, em maior concentração, durante a fase de amadurecimento. Assim, o azeite extraído na fase do amadurecimento é de elevada qualidade e, particularmente rico em compostos voláteis e aromáticos, os quais estão diretamente relacionados com o aroma do azeite.

Concretamente, a formação destes compostos ocorre maioritariamente por ação enzimática, quando os tecidos constituintes da azeitona sofrem rutura levando à

libertação das enzimas, maioritariamente na etapa da moenda (esmagamento da azeitona) e termobatedura (Kalua *et al.*, 2007). Este processo enzimático, que se encontra ilustrado esquematicamente na figura 11, inicia-se por ação das enzimas lipoxigenase e hidropoxidolise que promovem a oxidação e a quebra das duplas ligações presentes nos ácidos gordos polinsaturados a aldeídos, os quais são subsequentemente reduzidos a álcoois pela álcool desidrogenase e, em seguida, os álcoois reduzidos a ésteres pela álcool acetil transferase (Angerosa *et al.*, 2004; Gomes da Silva *et al.*, 2011).

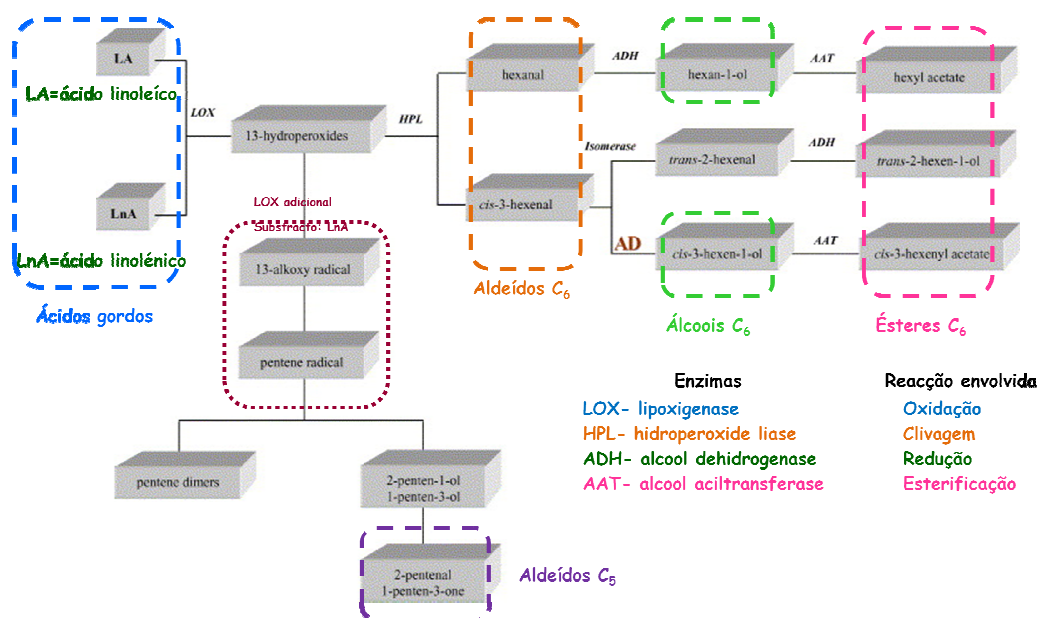


Figura 11 - Biossíntese dos compostos do aroma: via da lipoxigenase (adaptado de Angerosa *et al.*, 2004).

Como ilustrado na figura 11, a quebra enzimática dos ácidos linoleico e linolénico leva à formação de aldeídos C₆ e, que posteriormente, originam álcoois C₆ e ésteres C₆ (Sanchez-Ortiz *et al.*, 2008). A produção deste tipo de compostos por ação da lipoxigenase contribui significativamente para o aroma do azeite. Os compostos voláteis podem ser adicionalmente obtidos por outras vias, tais como a conversão dos aminoácidos, a fermentação dos açúcares, a autooxidação e o metabolismo dos aminoácidos. Contudo, os três primeiros fenómenos descritos anteriormente encontram-se intimamente relacionados com a presença de “off-flavours” no azeite (Kalua *et al.*, 2007).

Num estudo realizado por Angerosa *et al.* (1999) é demonstrada a relevância dos compostos C₅ na fração volátil do azeite, os quais são produzidos por um ramo adicional da via da lipoxigenase, como evidenciado na figura 11. Neste processo, os compostos C₅ podem dimerizar, dando origem a hidrocarbonetos insaturados isoméricos C₁₀ (dímeros de penteno) ou ligar-se a um radical hidroxilo presente no meio, produzindo álcoois C₅, que podem ser oxidados aos compostos carbonilos correspondentes (Angerosa *et al.*, 2004).

2.1.2. Qualidade do azeite

Em termos genéricos, a qualidade de um produto pode ser definida pelo conjunto de características intrínsecas, as quais permitirão a sua diferenciação como melhor ou pior comparativamente com outros produtos do mesmo tipo (Granados, 2000). Assim, a garantia de qualidade de um dado produto reveste-se da maior importância pois pode ser considerado como um fator fundamental para o aumento da confiança por parte do consumidor e conseqüente fidelização no consumo de determinado produto.

Em particular para o azeite, a sua qualidade é um aspeto complexo do ponto de vista comercial uma vez que deverá ser tida em conta a vertente nutricional assim como a organolética. No que respeita ao valor nutricional, a presença de elevados teores de ácido oleico assim como de outros componentes minoritários referidos anteriormente representa uma significativa contribuição para as propriedades biológicas do azeite, enquanto que, os compostos voláteis, também referidos anteriormente como componentes da fração insaponificável e presentes em concentrações diminutas, são os que apresentam uma maior contribuição para o cheiro e flavour únicos que o azeite nos proporciona.

O reconhecido valor nutritivo do azeite aliado às marcantes propriedades organoléticas conduziu ao aumento do seu consumo nas regiões mediterrânicas assim como à sua expansão a outras regiões do mundo, tendo como conseqüência o progressivo aumento do cultivo de oliveiras fora da região tradicional de produção (área mediterrânica). Contudo, é de salientar que a adaptabilidade das variedades, as diferentes condições climáticas e as práticas agrícolas podem também alterar a composição química do azeite e, inevitavelmente, a sua qualidade (Kalua *et al.*, 2007).

Assim, a qualidade deste produto de elevado valor económico encontra-se dependente de vários fatores que englobam quer o processo de produção quer o do armazenamento. Em concreto, o estabelecimento de normas comerciais e alimentares que garantam ao consumidor um produto de qualidade revestem-se de uma importância crucial para assegurar a “qualidade alimentar” deste tipo de produto. Assim, o conhecimento das propriedades físico-químicas e organolépticas do produto e dos parâmetros que determinam as suas características são fundamentais para avaliar a sua qualidade.

Deste modo, foram definidos como parâmetros químicos da qualidade para os azeites, as seguintes determinações: o grau de acidez, o índice de peróxidos e a absorvância no ultravioleta. A análise sensorial é outro dos parâmetros a considerar na avaliação da qualidade do azeite.

Grau de acidez

O grau de acidez é a medida da quantidade de ácidos gordos livres, expressa em ácido oleico. Os ácidos gordos livres resultam de uma reação de hidrólise, pelo que esta determinação permite avaliar se o azeite esteve em contacto com a água durante o processo de fabrico. Apesar de este parâmetro ser considerado um indicador da frescura do azeite, quanto mais elevada for a acidez, maior será a presença de ranço e a deterioração do azeite (Custódio, 2009). A partir de certos limites (até 2%), o azeite pode deixar de estar apto para consumo e terá que sofrer processos químicos (refinação) pelo que este parâmetro, quando presente em teores consideráveis, pode ser considerado como um fator negativo (Granados, 2000).

De acordo com a legislação vigente (Regulamento (CE) nº 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004, anexo I), o azeite pode ser classificado da seguinte forma atendendo ao processo de extração e aos teores em acidez livre:

Azeites Virgens: Azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Os azeites virgens, de acordo com a sua qualidade são classificados e denominados do seguinte modo:

a) **Azeite virgem extra:** Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g.

b) **Azeite virgem:** Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g.

c) **Azeite lampante:** Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100 g.

Azeite refinado: Azeite obtido por refinação de azeite virgem, com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 0,3 g por 100 g.

Azeite: composto por azeite refinado e azeite virgem - Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g.

Índice de peróxidos

O índice de peróxidos (IP) mede o estado de oxidação inicial do azeite indicando também, a deterioração que podem ter sofrido certos componentes de interesse nutricional, como a vitamina E. O seu limite de consumo corresponde a 20 meq O₂/kg de azeite (Granados, 2000).

Índices espectrofotométricos

A absorvância no ultravioleta utiliza-se para detetar os compostos oxidados anormais num azeite virgem (Granados, 2000). Os valores dos coeficientes específicos K_{270} , K_{232} e ΔK são utilizados para avaliar a autenticidade e a qualidade do azeite, sendo o K_{270} o coeficiente de extinção específica a 270 nm e o K_{232} o coeficiente de extinção específica a 232 nm (Kiritsakis, 1992; Boskou, 1998).

Os hidroperóxidos conjugados absorvem a 232 nm, enquanto os produtos da oxidação secundária (aldeídos e cetonas), absorvem a outros comprimentos de onda (262, 268, 270 e 274 nm). Os dienos e trienos conjugados, formados durante o processo de refinação, também absorvem a 270 nm, ou seja, valores baixos destes coeficientes específicos correspondem a um azeite de boa qualidade (Kiritsakis, 1992).

Na tabela 3, encontram-se sumarizados os parâmetros químicos da qualidade e de que forma os seus teores influenciam a classificação dos azeites.

Tabela 3 - Classificação do azeite com base nos parâmetros químicos da qualidade.

Categoria do Azeite	Acidez (%)	Índice de peróxidos (mEq O₂/Kg)	K₂₃₂	K₂₇₀	ΔK
Azeite virgem extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Azeite virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Azeite lampante	> 2,0	-	-	-	-
Azeite refinado	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 1,10	≤ 0,16
Azeite constituído por azeites refinados e azeites virgens	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 0,90	≤ 0,15
Óleo de bagaço bruto	-	-	-	-	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 2,00	≤ 0,20
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,0	≤ 15	≤	≤ 1,70	≤ 0,18

Fonte: Adaptado do Regulamento (CE) nº1989/2003 da comissão de 6 de Novembro de 2003

Análise sensorial

A análise sensorial do azeite é efetuada por um painel de provadores treinados para esse efeito de modo a avaliar as suas características organoléticas, tais como o aroma, o sabor, o aspeto ou a cor. No caso dessas sensações percecionadas pelos sentidos serem agradáveis são denominadas por atributos, pelo contrário, são denominados por defeitos as sensações desagradáveis. Enquanto os primeiros são influenciados pela variedade e estado de maturação da azeitona, os segundos encontram-se relacionados com o mau estado de conservação da azeitona ou com as inadequadas condições de processamento e armazenamento (Custódio, 2009).

Porém, a análise sensorial requer um período de treino demorado e dispendioso dos membros do painel de provadores de modo a nivelar as diferentes sensibilidades de cada membro (Vichi *et al*, 2003).

No que respeita ao azeite, as principais características sensoriais são o frutado de azeitona ou de outros frutos maduros, o verde de folha ou erva, o amargo, o picante e o doce. Relativamente ao aspeto deverá ser observada a sua limpidez, à temperatura ambiente, e a presença ou a ausência de depósito, assim como a sua coloração (Gouveia, 1995).

Alguns estudos revelaram que as características naturais que diferenciam os vários azeites do ponto de vista organolético dependem de fatores agronómicos, tais como a variedade da azeitona, as práticas culturais utilizadas, o solo e o clima (Gouveia, 1995; Kiritsakis, 1992). As características organoléticas do azeite são ainda influenciadas por diversos fatores relacionados com a colheita (procedimento de colheita e estado de maturação da azeitona), com a moenda e o modo de extração do azeite, com as medidas higiénicas e sanitárias adotadas ao longo de todo o processo e, ainda, com as condições de embalagem e armazenamento (Gouveia, 1995; Kiritsakis, 1992).

2.1.3. Reações de degradação do azeite

Os dois fenómenos químicos que conduzem à deterioração do azeite são a hidrólise, que no caso específico do azeite é designada por lipólise e a oxidação. Enquanto a lipólise ocorre ainda ao nível do fruto (azeitona), a oxidação apresenta uma maior expressão durante a fase da extração e do armazenamento (Kiritsakis, 1992).

As reações de degradação do azeite anteriormente referidas provocam alterações na composição química deste tipo de produto pelo que as suas características sensoriais e propriedades nutritivas sofrem também modificações que poderão ser relativamente significativas. O ranço surge como um principais fenómenos associados à deterioração do azeite (Santos, 2009).

A lipólise é uma reação de hidrólise dos triacilgliceróis que conduz à libertação de ácidos gordos livres, sendo responsável pelo aumento do grau de acidez do azeite. Os principais fatores que promovem estas reações de hidrólise são a humidade e a temperatura (Kiritsakis, 1992; Gouveia, 1995).

Existem dois tipos de lipólise, a microbiana que tal como o nome indica é promovida por microrganismos (leveduras, fungos, bactérias) presentes nas azeitonas e a enzimática que é conduzida pelas enzimas naturais da azeitona - as lípases (Kiritsakis, 1992).

O fenómeno de deterioração oxidativa ocorre quando o azeite entra em contacto com o oxigénio, apesar de existirem substâncias presentes no tecido celular da planta que podem retardar a oxidação, denominados por antioxidantes. Em concreto, durante este processo ocorre uma reação entre os ácidos gordos insaturados, presentes no azeite e o

oxigénio pelo que a oxidação do azeite conduz à diminuição dos teores dos ácidos linoleico e linolénico e algumas vitaminas lipossolúveis (Aparício e Harwood, 2003)

Segundo Velasco e Dobarganes (2002), a composição em ácidos gordos do azeite em que existe um elevado rácio entre os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados aliada ao facto de existirem uma grande variedade de componentes minoritários com propriedades antioxidantes (p. ex: polifenóis, tocoferóis e carotenóides) contribui de forma muito significativa para a resistência à deterioração oxidativa que o azeite apresenta.

Em suma, o processo de oxidação do azeite é favorecido por diversos fatores, tais como:

- contacto com o oxigénio – inicialmente o processo é lento devido à presença de antioxidantes mas quando atingido um determinado nível de peróxidos a velocidade da reação acelera e surge o cheiro a ranço;
- temperatura - acelera a oxidação favorecendo a formação de peróxidos e, posterior, decomposição em aldeídos e cetonas;
- luz - favorece a reação do azeite com o oxigénio;
- presença de metais - produzem um efeito catalizador da auto-oxidação, apesar de estarem presentes em quantidades diminutas, conferindo ao azeite um sabor metálico (Villalta, 1999).

De uma forma geral, o mecanismo da auto-oxidação envolve três etapas distintas: iniciação, propagação e finalização ou término (Ramalho *et al.*, 2006), que englobam fundamentalmente reações radicalares. O processo global encontra-se representado esquematicamente na figura 12.

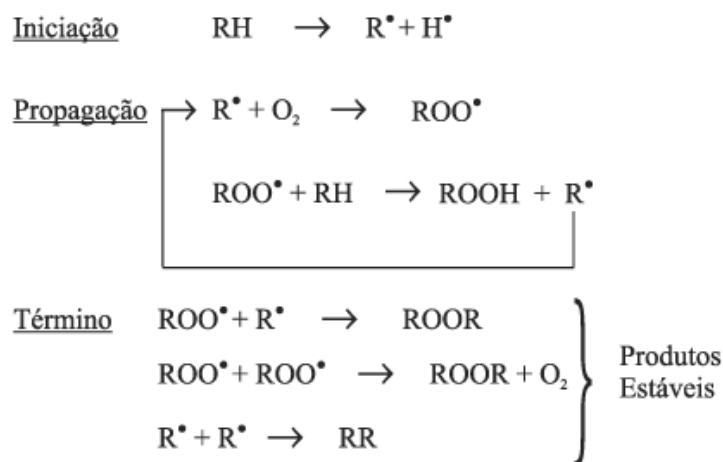


Figura 12 - Representação geral do mecanismo da oxidação lipídica, onde RH- ácido gordo insaturado, R^\bullet - radical livre, ROO^\bullet - radical peróxido e ROOH- hidroperóxido (Ramalho *et al.*, 2006).

Por observação da figura 12, na fase da iniciação ocorre a formação de radicais livres do ácido gordo (R^\bullet), a qual é favorecida por fatores como a luz e o calor. Na etapa subsequente, estes radicais livres que são muito reativos em presença do oxigénio atmosférico são convertidos noutros radicais surgindo, nesta fase, os produtos de oxidação primários (peróxidos ROO^\bullet e hidroperóxidos ROOH). É de salientar que os radicais livres formados atuam como propagadores da reação. Por último, a auto-oxidação é finalizada com a ocorrência de reações entre os diferentes radicais levando à formação de produtos estáveis denominados por produtos secundários da oxidação (Ramalho *et al.*, 2006).

Em suma, o processo de deterioração oxidativa pode seguir a via enzimática (designado por lipólise) ou química sendo que, neste caso, as reações podem ocorrer na ausência ou na presença de luz, sendo denominadas por auto-oxidação e foto-oxidação, respetivamente.

2.1.4. Condições de armazenamento do azeite

A garantia da qualidade do azeite é uma das maiores preocupações da indústria que produz e comercializa este produto. Em particular, é crucial que se consiga preservar e garantir os atributos do azeite durante o tempo que decorre desde a produção e embalagem até ao consumo (Caponio *et al.*, 2005).

Durante o armazenamento do azeite pode ocorrer um aumento de acidez devido fundamentalmente a dois processos oxidativos - oxidação enzimática e auto-oxidação, pelo que, se torna essencial tomar as devidas precauções para prevenir e evitar a sua deterioração (Boskou, 1998).

Atendendo a que os azeites podem sofrer degradação durante o processo de armazenamento é necessário ter em conta algumas características que os depósitos de azeite deverão possuir, dos quais se destacam (Fernández (1991) e Aparício e Harwood (2003)):

- Ser construído em materiais impermeáveis ao azeite para que este não penetre na superfície do depósito uma vez que esse fato dificultaria a sua limpeza, favorecendo possíveis alterações. Idealmente, os depósitos devem ser de aço inoxidável pois a utilização de contentores de outros tipos de metais pode ter um efeito negativo sobre algumas características sensoriais do azeite, tais como o aroma e o sabor (Villalta, 1999).
- O material usado para a construção dos depósitos deverá ser inerte, ou seja, não deve apresentar a menor reatividade química pois isso poderia introduzir contaminações no azeite, transferindo para este sabores e odores estranhos, bem como substâncias catalisadoras dos processos oxidativos;
- Deve-se proteger o azeite da luz e do ar, fatores que conduzem à alteração do produto;
- O azeite deve ser mantido a uma temperatura relativamente constante, entre os 15 - 25°C, evitando alterações bruscas de temperatura levando à perda de aromas e ocorrência de oxidações.

Um outro aspeto a ter ainda em conta no armazenamento do azeite é a base dos depósitos, a qual deverá ser construída de forma a permitir a decantação das borras do azeite que se vão acumulando no fundo dos contentores (Fernández *et al.*, 1991).

O azeite é armazenado em depósitos no lagar, antes de se proceder ao seu engarrafamento para ser depois comercializado. Nesta fase o azeite é filtrado e posteriormente engarrafado, usualmente em garrafas de vidro. O material de embalagem deverá ser o mais indicado para proteger o azeite dos normais processos de oxidação. Assim, cada vez mais é possível verificar a substituição das habituais garrafas de vidro transparente por garrafas de vidro escuro, com o objetivo de proteger o azeite da luz minimizando desta forma o eventual processo de degradação do azeite. Estudos recentes têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar a viabilidade de utilizar materiais alternativos de embalagem (por exemplo PET), que permitam conservar as características do azeite até ao momento do seu consumo (Cecchi *et al*, 2010, Pristouri *et al*, 2010).

Como referido anteriormente, um dos fenómenos que mais contribui para a degradação do azeite durante a etapa do armazenamento é a oxidação. Assim, dada a sua importância, esta reação de degradação deverá ser controlada pelo que se torna essencial compreender os fatores externos que a afetam. De entre esses fatores destacam-se a temperatura, a luz, a concentração de oxigénio e a presença de metais uma vez que são aqueles que apresentam uma contribuição mais significativa na oxidação do azeite (Kalua *et al*, 2007). Contudo, uma vez que no contexto do presente trabalho se pretende estudar o efeito da exposição do azeite à luz nos parâmetros químicos da qualidade, este aspeto será focado em detalhe na revisão descrita em seguida.

2.1.4.1. Influência da luz

Os azeites possuem na sua constituição compostos sensíveis à luz, denominados por fotossensíveis, que se ativam quando expostos a este parâmetro. Quando o azeite é exposto à luz pode ocorrer a formação de hidroperóxidos através de reações de foto-oxidação ou de auto-oxidação fotolítica, sendo este fenómeno também observado quando o azeite está em contacto com o oxigénio (Aparício e Harwood, 2003).

Em concreto, o efeito da luz é exercido através de compostos minoritários do azeite que atuam como fotosensibilizadores, tais como clorofila, riboflavina que podem ser eletronicamente excitados por absorção da energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível transferindo-a, em seguida, para a molécula de oxigénio ($^3\text{O}_2$) produzindo o estado de singleto ($^1\text{O}_2$). Esta molécula reage diretamente com as ligações duplas dos ácidos gordos formando hidroperóxidos que, por posterior degradação,

originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (Ramalho *et al.*, 2006; Kalua *et al.*, 2007). Assim, a proteção do azeite da luz direta é essencial para assegurar a sua qualidade (Pristouri, 2010). É de salientar que a exposição dos azeites à luz ocorre com maior significado durante a etapa da distribuição comercial.

Nos últimos anos, a influência do parâmetro luz na qualidade dos azeites tem sido alvo de diversos trabalhos de investigação, os quais incidiram fundamentalmente no estudo da variação dos parâmetros químicos da qualidade (Pagliarini *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2002; Caponio *et al.*, 2005; Kalua *et al.*, 2006; Méndez *et al.*, 2007; Vekiari *et al.*, 2007; Pristouri *et al.*, 2010). Contudo, alguns desses estudos têm sido também estendidos à determinação da variação dos teores de componentes minoritários do azeite, tais como tocoferóis, carotenóides e clorofilas (Caponio *et al.*, 2005; Del Caro *et al.*, 2006) assim como de compostos voláteis e vitaminas (Messina *et al.*, 2009). Os estudos desenvolvidos por Caponio *et al.* (2005) e por Vekiari *et al.* (2007) evidenciaram que o tempo de vida útil dos azeites expostos a intensa luz artificial e luz difusa é relativamente mais curta do que para os azeites armazenados no escuro. As investigações de Torres *et al.* (2006) sobre o efeito da luz na composição química de azeite virgem da variedade Arbequina incidiram ainda nas condições de armazenamento, nomeadamente nos tipos de contentores utilizados para o armazenamento.

Estudos ainda mais recentes desenvolvidos por Samaniego- Sánchez *et al.* (2012) incidiram na alteração da composição química em azeites virgem extra da variedade Picual face a diferentes condições de armazenamento.

2.1.5. As variedades ‘Arbequina’, ‘Cobrançosa’ e ‘Picual’

2.1.5.1. ‘Arbequina’

A variedade ‘Arbequina’ é a mais importante da Catalunha sendo esta a sua principal área de cultivo, podendo também ser encontrada fora de Espanha, nomeadamente na Argentina.

É uma variedade muito resistente ao frio, de vigor reduzido o que permite a sua utilização em olivais intensivos e superintensivos. É muito apreciada pela sua precoce

entrada em produção, elevada produtividade, bom rendimento de gordura e excelente qualidade do seu azeite. Segundo Granados (2000), esta variedade é utilizada principalmente para transformação em lagar pois apresenta distintas características organoléticas, sendo recomendado para o tempero de saladas e verduras, apesar da sua baixa estabilidade.

2.1.5.2. ‘Cobrançosa’

É uma variedade Portuguesa utilizada para a produção de azeite, sendo cultivada sobretudo na zona de Trás-os-Montes, no entanto dadas as suas características o seu cultivo tem-se estendido a todo o país.

Esta variedade que apresenta um porte médio, precisa de solos férteis, produz um azeite de boa qualidade e tem um bom rendimento em gordura, cerca de 18 a 22%, a sua produtividade é elevada e constante, sendo mais utilizada para a produção de azeite e pouco utilizada para conserva.

É muito apreciada pela sua fácil adaptação a climas frios e resistência à clorose férrica originada pelos solos com calcário, é suscetível à seca e elevada salinidade.

2.1.5.3. ‘Picual’

É a variedade mais importante de Espanha, dominando as províncias de Jaén (97%), Córdoba (38%) e Granada (40%), sendo a base das novas plantações por todo o país (Barranco *et al*, 2008).

É muito apreciada pela sua precoce entrada em produção, a sua produtividade é elevada e constante apresenta um elevado rendimento em gordura e facilidade de cultivo.

A apreciação do seu azeite é média, apesar de se destacar por um elevado nível de estabilidade, o que significa que apresenta resistência ao desenvolvimento de ranço.

É uma variedade rústica pela sua adaptação a diversas condições de climas e de solos, em particular à sua tolerância ao frio, salinidade e excesso de humidade no solo. Contudo, esta variedade é relativamente sensível à seca e a terrenos calcários.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste ensaio foram analisados três azeites monovarietais, cujas variedades são Arbequina, Cobrançosa e Picual, fornecidos pela herdade da Fonte dos Frades localizada no concelho de Beja. As amostras estudadas foram colocadas em duas diferentes condições de armazenamento: expostas à luz natural e no escuro durante um período de oito meses e foram mantidas à temperatura ambiente. Foram utilizadas para o armazenamento das amostras, garrafas de vidro transparente, para as amostras armazenadas à luz e vidro escuro para as amostras armazenadas no escuro. As amostras foram recolhidas individualmente para garrafas, por cada variedade e para cada tempo, ficando desde o tempo inicial totalmente cheias por forma a minimizar o contato com o oxigénio. As amostras expostas à luz ficaram no laboratório numa zona com luminosidade mas sem sofrerem a incidência da luz direta, a luz à qual estiveram sujeitas não foi forçada pelo que durante a noite permaneceram no escuro. O ensaio decorreu de Abril a Dezembro, ao longo deste período foram recolhidas amostras de dois em dois meses e determinados os seguintes parâmetros químicos da qualidade: acidez, polifenóis totais, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos, ésteres metílicos dos ácidos gordos e tocoferóis. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

3.1. Métodos analíticos

3.1.1. Acidez

A acidez mede a percentagem de ácidos gordos que estão livres da estrutura dos triacilgliceróis, expressa em % de ácido oleico. Assim, a determinação da acidez baseia-se na neutralização dos ácidos gordos livres presentes nas amostras de azeite em estudo mediante titulação com uma solução aquosa de hidróxido de sódio cuja concentração é rigorosamente conhecida. (Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo II)

Experimentalmente, para a determinação deste parâmetro químico da qualidade procedeu-se da seguinte forma:

Pesou-se 10 g da amostra de azeite num balão erlenmeyer e, em seguida, adicionou-se 60 ml de uma mistura éter/etanol (1:1, (v/v)) previamente neutralizada com uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) de concentração 0,1N em presença de fenoftaleína (indicador). Posteriormente titulou-se, com agitação, com uma solução

aquosa de NaOH 0,1N, na presença de fenolftaleína, até que a coloração do titulado mude de incolor para carmim.

O valor da acidez (expresso em % de ácido oleico) é calculado através da seguinte expressão:

$$^{\circ}Ac = \frac{V \times 2,82}{m}$$

em que:

$^{\circ}Ac$ – grau de acidez, expressa em % de ácido oleico

V – volume da solução de hidróxido de sódio (0,1N) gasto na titulação, em mL

m – massa de azeite, em gramas

2,28 – fator resultante da massa molecular do ácido oleico

3.1.2. Polifenóis totais

A determinação dos polifenóis totais foi efetuada por espectrofotometria de UV-Vis (Caponio *et al*, 2005). A aplicação desta metodologia implica uma etapa prévia de preparação de amostra que envolve a extração dos compostos fenólicos presentes nas amostras de azeite em estudo, cujo procedimento experimental se indica em seguida:

Pesou-se rigorosamente 10,000 g da amostra de azeite e dissolveu-se em 25 mL de n-hexano. De seguida transferiu-se a mistura anterior para uma ampola de decantação de 100 mL, fizeram-se três extrações líquido-líquido consecutivas, utilizando-se para cada uma delas 10 mL de uma mistura de metanol/água (6:4 (v/v)). Os três extratos fenólicos foram recolhidos para um balão de 50 mL, e completou-se o seu volume com água destilada.

Posteriormente, num balão volumétrico de 25 mL colocou-se 14 mL de água destilada, 5 mL do extrato fenólico (obtido anteriormente) e 1,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se energeticamente e colocou-se, de seguida, no escuro durante três minutos. Ao fim desse tempo, adicionou-se ao balão volumétrico 4 mL de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_4) a 20%, previamente preparada, completando-se o restante volume com água destilada. Agitou-se a mistura e colocou-se novamente no escuro durante 1 hora.

Após esse tempo, transferiu-se parte do conteúdo do balão de 25 mL para tubos de centrífuga, de forma a efetuar-se a centrifugação da solução, eliminando-se deste modo, partículas em suspensão que muitas vezes são responsáveis por interferências indesejáveis na determinação espectrofotométrica. Em seguida, uma alíquota da solução centrifugada foi colocada numa célula espectrofotométrica, procedendo-se à respetiva leitura da absorvância no espectrofotómetro ao comprimento de onda de 725 nm.

O resultado do teor de polifenóis totais (expresso em mg/kg) nas amostras em estudo pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\text{Polifenóis totais} = \frac{(8,53993721 \times \text{leitura} - 0,24765388) \times 10 \times 25}{\text{massa da amostra}}$$

3.1.3. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos define-se pela quantidade de oxigénio ativo, expressa em miliequivalentes de O₂, contida num quilograma de gordura ou óleo.

A determinação do índice de peróxidos baseia-se na oxidação do iodeto de potássio, em meio acético, pelo oxigénio ativo de uma massa de azeite, de acordo com o procedimento experimental referido no Regulamento (CE) n° 2568/91, anexo III.

Para a determinação deste parâmetro químico da qualidade procedeu-se da seguinte forma:

Pesou-se 2 g de amostra de azeite para um balão erlenmeyer com tampa, adicionou-se 10 mL de clorofórmio e, agitou-se a mistura de modo a facilitar a dissolução do azeite. Adicionou-se, à mistura anterior, 15 mL de ácido acético glacial e seguidamente adicionou-se 1 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio, tapou-se rapidamente, agitou-se durante um minuto e colocou-se a mistura na ausência de luz durante 15 minutos a uma temperatura de 15 a 20°C.

Decorrido esse tempo, adicionou-se 75 mL de água destilada e, de seguida, o iodo livre presente em solução é titulado por uma solução aquosa de tiosulfato de sódio com concentração rigorosamente conhecida, na presença de 2 mL de uma solução de cozimento de amido a 1%, como indicador.

O índice de peróxidos, é obtido por aplicação da seguinte expressão:

$$\text{I.P.} = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

I.P. – índice de peróxidos expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por kg de azeite (meq O₂/Kg azeite)

V – volume de solução de tiosulfato de sódio utilizada (em mL)

N – normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio utilizada

m – massa, em gramas, da toma da amostra de azeite

3.1.4. Índices espectrofotométricos

Apesar do azeite ser considerado extremamente resistente à oxidação devido aos baixos teores em ácidos gordos polinsaturados e à presença de antioxidantes naturais, nomeadamente α - tocoferol e alguns compostos fenólicos é suscetível à oxidação pelo que a determinação do índice espectrofotométrico é um parâmetro importante dado que permite avaliar a presença de produtos primários e secundários de oxidação, os quais alteram a qualidade do azeite.

A degradação do azeite ocorre através de uma cascata de reações bioquímicas/enzimáticas que se iniciam com a decomposição dos ácidos gordos insaturados e que originam a formação de hidroperóxidos. A instabilidade inerente a estes compostos conduz à formação de outros compostos químicos resultantes da oxidação secundária (aldeídos e cetonas) e de sistemas conjugados (dienos e trienos). Os hidroperóxidos absorvem ao comprimento de onda de 232 nm, enquanto que os aldeídos e cetonas absorvem aos comprimentos de onda de 262, 268, 270 e 274 nm. Os dienos e trienos conjugados absorvem ao comprimento de onda de 270 nm.

Na prática, este método consiste na determinação, utilizando a espectrofotometria de UV-Vis, de três parâmetros experimentais denominados como coeficientes de extinção a um dado comprimento de onda (K_{232} , K_{270} e ΔK). Os coeficientes K_{232} e K_{270} estão relacionados com a presença de dienos e trienos conjugados, respectivamente. Contudo, os produtos resultantes da oxidação secundária (p. ex: aldeídos, cetonas) contribuem para o coeficiente K_{270} . Experimentalmente, esta determinação envolve a dissolução da amostra de azeite num solvente adequado (neste caso iso-octano), seguida da leitura da

absorvância destas soluções a determinados comprimentos de onda, o que permite calcular os respectivos coeficientes de extinção.

O procedimento experimental para a determinação dos índices espectrofotométricos foi baseado no Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo IX, tendo sido o seguinte:

Pesou-se 0,1 g de amostra de azeite num balão volumétrico de 10 mL e adicionou-se iso-octano até perfazer o volume. Retirou-se uma alíquota desta solução e mediu-se as respectivas absorvâncias numa gama de comprimentos de onda 230 - 274 nm com intervalos de 2 nm. As determinações espectrofotométricas foram determinadas no espectrofotómetro Lange HACH DR 5000. Os coeficientes de extinção K_{232} , K_{270} e ΔK foram calculados atendendo às expressões:

$$K_{232} = A / cl$$

$$K_{270} = A / cl$$

$$\Delta K = K_{270} - [(A_{266} + A_{274}) / 2]$$

em que:

A_{270} , A_{232} , A_{266} e A_{274} são as absorvâncias aos comprimentos de onda de 270, 232, 266 e 274 nm ; c é a concentração do azeite em g/100 mL e l é o percurso óptico (1 cm).

3.1.5. Ésteres metílicos dos ácidos gordos

A determinação do perfil em ácidos gordos nas amostras de azeite em estudo foi efetuada recorrendo à cromatografia gasosa. No entanto, para que esta determinação seja possível através desta técnica cromatográfica os ácidos gordos têm que ser convertidos nos correspondentes derivados ésteres metílicos pois estes compostos já possuem a volatilidade adequada que permite a sua análise por GC. Deste modo, a determinação do perfil em ácidos gordos nas amostras de azeite em estudo envolve um procedimento prévio de preparação dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos, o qual envolve uma etapa de saponificação seguida de esterificação a frio de uma toma de azeite mediante a utilização de uma solução metanólica de hidróxido de potássio, como ilustrado na figura 13. É de salientar que esta metodologia é aplicável aos azeites e óleos de bagaço de azeitona cujo teor de ácidos gordos livres seja inferior a 3,3 %.

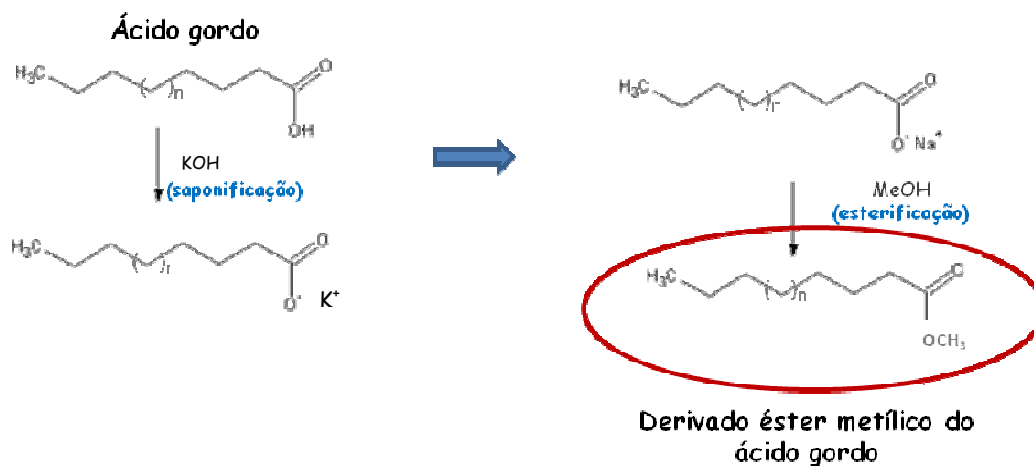


Figura 13 - Esquema ilustrativo da obtenção dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos.

Uma vez obtidos os derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos correspondentes, a identificação e quantificação dos derivados foi efetuada recorrendo à cromatografia gasosa (GC) equipada com um detetor de ionização de chama (FID). Para a identificação dos derivados foi analisada, utilizando as mesmas condições cromatográficas, uma mistura de compostos padrão e, comparados os seus tempos de retenção com os das amostras em estudo.

O procedimento experimental para a determinação dos teores em ácidos gordos foi baseado no Regulamento (CE) nº 2568/91, anexo XX, e envolve duas etapas, as quais se sumarizam em seguida:

1ª etapa - Preparação dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos

Para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 5 mL, pesou-se cerca de 0,1 g da amostra de azeite. Juntou-se 2 mL de heptano e agitou-se, seguidamente adicionou-se 0,2 mL da solução metanólica 2 N de hidróxido de potássio, tapou-se, fechou-se bem e agitou-se energicamente durante 30 segundos. Deixou-se repousar até que a parte superior da solução ficasse límpida. Decantou-se a camada superior, que contém os ésteres metílicos dos ácidos gordos e, recolheu-se uma alíquota, que foi em seguida analisada no cromatógrafo gasoso.

2ª etapa- Análise cromatográfica por GC

As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard HP6890, equipado com um detetor de ionização de chama. As condições cromatográficas utilizadas para a análise dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes nas amostras de azeite em estudo encontram-se sumarizadas na tabela 4.

Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas na análise dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos.

Cromatógrafo	HP6890 série
Inlet	Split
Detector	FID (Detetor com ionização de chama)
Amostrador automático	Agilent 7683 series injector
Coluna	30 m x 0.32 mm ID, 0.25 µm espessura de filme
Temperatura Inlet	250 °C
Volume de Injeção	1 µL
Split ratio	20:1
Gás de arraste	Hélio
Head pressure	1,0 mL/min constant flow
Temperatura do Forno	140 °C, 5 min, 4°C/min, 240°C, 10 min
Temperatura do Detector	250°C
Detector de gás	Hidrogénio: 35mL/min; Ar:400mL/min; Helium make-up gas: 5,0mL/min

3.1.6. Tocoferóis

A determinação do teor em α - tocoferol das amostras de azeite em estudo foi efetuada mediante análise de uma alíquota de azeite por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipado com um detetor de díodos DAD (Gimeno *et al*, 2000). A identificação do composto nos cromatogramas relativos à análise das amostras de azeite em estudo foi realizada através da comparação dos tempos de retenção bem como dos espectros de UV-Vis obtidos com os do composto padrão disponível comercialmente.

O procedimento experimental para a determinação do teor em α - tocoferol nas amostras envolveu uma etapa de preparação de amostra seguida da análise cromatográfica por HPLC-DAD, como indicado em seguida:

1ª etapa: preparação da amostra

Num erlenmeyer colocou-se 1,5g de azeite e adicionou-se 10 mL de n-hexano. Posteriormente, num tubo de centrífuga colocou-se 200 µL da solução anterior e adicionou-se 600 µL de metanol e 200 µL da solução de uma solução de acetato de α -tocoferol com a concentração de 0,3 mg/mL, o qual é utilizado como padrão interno. Seguidamente as amostras foram agitadas num Vórtex e, posteriormente, centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Retirou-se uma alíquota da solução anterior e filtrou-se com um filtro descartável de 0,45 µm e procedeu-se à sua análise por HPLC- DAD.

2ª etapa- Análise cromatográfica por HPLC

As condições cromatográficas utilizadas para a análise do teor em α -tocoferol presentes nas amostras de azeite em estudo encontram-se sumarizadas na tabela 5.

Tabela 5 – Condições cromatográficas utilizadas na análise do teor em α -tocoferol presentes nas amostras de azeite em estudo

Cromatógrafo	HPLC Ultimate 3000 Dionex
Detector	DAD – R1 (Detetor de diodos)
Coluna	Lichrospher 100 RP-18 (5 µm) 250 mm x 4 mm (Merck, Darmstadt, Germany)
Temperatura do forno	45 °C
Volume de Injeção	50 µL
Fluxo	2,0 mL/min
Eluentes	A- metanol, B- água destilada
Sistema de eluição	Isocrático (A:B) (96:4(v/v))
λ deteção (nm)	292

A quantificação do teor em α -tocoferol nos azeites em estudo é efetuada mediante o método do padrão interno, o qual envolve o traçado de uma curva de calibração elaborada a partir da análise cromatográfica de soluções padrão de α - tocoferol (usando o acetato de α - tocoferol como PI) cuja concentração é rigorosamente conhecida. Por interpolação do valor da área relativa ao composto em análise correspondente às amostras de azeite em estudo é possível determinar o teor em α -tocoferol presente nessas amostras. Todas as amostras foram injetadas em duplicado.

3.2. Análise estatística de resultados

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), considerando como fatores de variação o tempo (inicial e final) e as condições de armazenamento (luz e escuro), para cada uma das variedades em estudo. O teste de comparação de médias utilizado foi o Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test, para um nível de confiança de 95%. A análise foi efetuada com o programa NCSS 6.0 (Statistical & Power Analysis Software, Kaysville, UT, USA).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De forma a elucidar de que modo é que o fator luz influencia os parâmetros químicos da qualidade estudados no âmbito deste trabalho optou-se por efetuar a apresentação e discussão detalhada dos resultados obtidos para cada uma das determinações individualmente.

4.1. Acidez

Na tabela 6 encontram-se representados os teores de acidez (expressos em % de ácido oleico) para os diferentes azeites monovarietais em estudo, os quais foram submetidos a diferentes condições de armazenamento – luz e escuro, durante um período de 8 meses.

Tabela 6 – Teores de acidez para os diferentes azeites monovarietais em estudo em função das condições de armazenamento (expressos em % de ácido oleico).

Variedade	Luz				
	0 Meses	2 Meses	4 Meses	6 Meses	8 Meses
Arbequina	0,20 ^a ± 0,001	0,17 ± 0,001	0,22 ± 0,009	0,17 ± 0,004	0,16 ^b ± 0,005
Cobrançosa	0,23 ^a ± 0,007	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ^b ± 0,007
Picual	0,25 ^a ± 0,002	0,20 ± 0,0002	0,22 ± 0,001	0,17 ± 0,002	0,19 ^c ± 0,0002

Variedade	Escuro				
	0 Meses	2 Meses	4 Meses	6 Meses	8 Meses
Arbequina	0,20 ^a ± 0,001	0,17 ± 0,001	0,21 ± 0,009	0,17 ± 0,004	0,16 ^b ± 0,01
Cobrançosa	0,23 ^a ± 0,007	0,20 ± 0,001	0,22 ± 0,003	0,14 ± 0,01	0,16 ^b ± 0,01
Picual	0,25 ^a ± 0,002	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,0004	0,14 ± 0,006	0,16 ^b ± 0,002

Legenda: Letras diferentes na linha denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

Em relação ao parâmetro da acidez verificou-se que, nas condições de armazenamento e tempos de armazenamento estudados, as amostras de azeite analisadas apresentam valores de acidez no tempo inicial, que se encontram compreendidos no intervalo 0,20-0,25%, valores que são bastante inferiores ao limite máximo estipulado na legislação ($\leq 0,8\%$) para a categoria de “azeites virgem extra”. Por observação da tabela 6 verifica-se o aumento dos teores de acidez para o tempo correspondente aos quatro meses de armazenamento, contudo esses valores decrescem atingindo valores de acidez relativamente mais baixos nas amostras correspondentes ao tempo de armazenamento de seis e oito meses. Atendendo ao tratamento estatístico efetuado pode afirmar-se que a

acidez do azeite nas diferentes variedades apresenta diferenças significativas do tempo inicial para o tempo final (oito meses). Dado que a acidez é um parâmetro que permite inferir a percentagem de ácidos gordos livres e que estes se oxidam mais facilmente do que quando esterificados na molécula de glicerol, pode concluir-se que neste estudo o parâmetro luz não revelou uma influência significativamente no teor em ácidos gordos livres. Resultado semelhante foi também observado por Caponio *et al.* (2005) e Del Caro *et al.* (2006) em estudos da influência da exposição à luz de azeites extra virgem das variedades *Coratina* e *Bosana cv* respectivamente, quando submetidos a condições de armazenamento idênticas às do presente trabalho. Contudo, estudos desenvolvidos por outros autores demonstraram que a exposição de azeites, monovarietais das variedades Picual e Hojiblanca, à luz conduz geralmente a um aumento dos teores de acidez (Guil-Guerrero e Urda-Romacho, 2009). No entanto, esses aumentos são geralmente bastante diminutos pelo que, frequentemente, não ocorre a perda da classificação de “azeite virgem extra” (Gutiérrez e Fernández, 2002). Gómez- Alonso *et al.* (2007) verificaram que a acidez do azeite aumenta com o tempo de armazenamento, quer este seja guardado no escuro ou exposto à luz.

4.2. Polifenóis totais

O teor em polifenóis totais é outra das determinações relevantes na avaliação da qualidade química dos azeites. Na tabela 7 encontram-se indicados os valores de concentração em polifenóis totais, expressos em mg ácido gálico/Kg azeite, para os diferentes azeites monovarietais estudados nas condições de armazenamento de luz e escuro.

Tabela 7 – Valores de concentração de polifenóis totais para os diferentes azeites monovarietais em estudo em função das condições de armazenamento (expressos em mg de ácido gálico/kg azeite).

Variedade	Luz				Escuro			
	0 Meses	2 Meses	6 Meses	8 Meses	0 Meses	2 Meses	6 Meses	8 Meses
Arbequina	99,86 ^a ±2,6	89,94±0,5	90,72±2,5	81,84±7,7	99,86 ^a ±2,6	- ⁽¹⁾	69,02±12,2	78,85 ^b ±4,4
Cobrançosa	220,59 ^a ±2,8	210,01±21,8	188,91±6,0	207,88±10,8	220,59 ^a ±2,8	211,67±21,1	181,51±13,2	182,78 ^b ±6,9
Picual	227,3 ^a ±2,2	189,0±1,2	186,23±3,8	209,08 ^c ±0,5	227,3 ^a ±2,2	226,94±6,0	164,07±14,1	149,17 ^b ±9,0

Legenda: Letras diferentes na linha denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer

Multiple Comparison Test; (1) – O valor não é apresentado devido a erro experimental.

Atendendo que o conteúdo em polifenóis de um azeite depende da variedade, da localização geográfica, da altitude, do grau de maturação e do processo de extração utilizado para a obtenção do azeite (García *et al.*, 2003) seria expectável a existência de diferenças nestes teores para os diferentes azeites monovarietais em estudo neste trabalho. Por observação da tabela 7, o azeite da variedade Picual é o que apresenta os valores mais elevados (227,30 mg/Kg azeite) enquanto o da variedade Arbequina exhibe os teores mais baixos (99,86 mg/kg azeite), no tempo inicial. Os valores obtidos para estes azeites monovarietais encontram-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos por estudos desenvolvidos por outros autores para estas espécies varietais, utilizando o mesmo método de quantificação (Santos, 2009; Torres *et al.*, 2006; Matos *et al.*, 2007).

Após análise estatística é possível afirmar que existem diferenças significativas nos resultados obtidos para o tempo inicial em relação aos oito meses. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e, que se encontram sumarizados na tabela 7, é notório que, no geral, ocorre uma diminuição na concentração de polifenóis totais ao longo dos oito meses de armazenamento, sendo que a variedade Arbequina é aquela que apresenta uma menor concentração destes compostos em ambas as condições de armazenamento. Esta constatação é corroborada pelos trabalhos de diversos autores (Gutiérrez e Fernández, 2002; Caponio *et al.*, 2005; Fadda *et al.*, 2012). A diminuição dos teores destes compostos durante o armazenamento do azeite é atribuída à ocorrência de processos hidrolíticos e oxidativos (Samaniego- Sánchez *et al.*, 2012).

No que respeita às análises efetuadas aos quatro meses de armazenamento, os valores dos polifenóis totais decresceu abruptamente tendo-se verificado um aumento dos valores correspondentes aos seis meses de armazenamento. Este facto ficou a dever-se a um erro experimental devido a uma avaria no espectrofotómetro pelo que, para a análise dos resultados, optou-se por ignorar os teores correspondentes a este tempo de armazenamento, dado que não foram congeladas amostras correspondentes a este tempo de armazenamento não foi possível proceder à repetição do ensaio.

4.3. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos (IP) indica-nos o estado de oxidação do azeite através da medida dos produtos primários da oxidação que não deve exceder, segundo a legislação, os 20 meq O₂/Kg de azeite. Em seguida, são apresentados os resultados obtidos neste estudo

para os azeites monovarietais - Arbequina, Cobrançosa e Picual, nas figuras 14, 15 e 16 respectivamente, nas diferentes condições de armazenamento (luz e escuro).

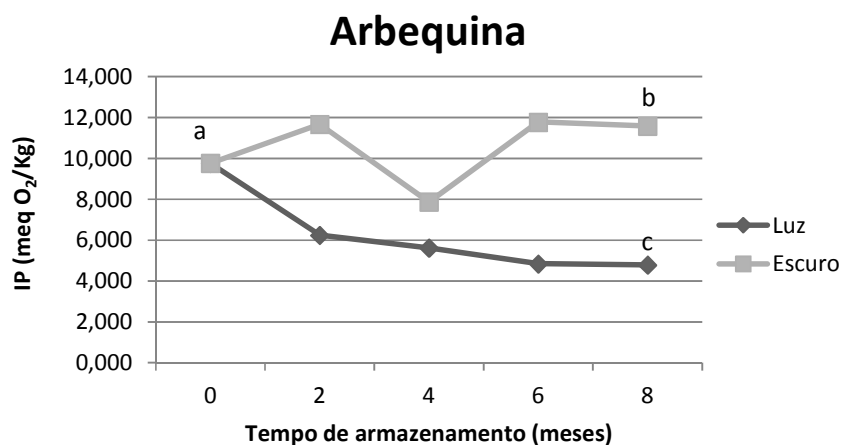


Figura 14 – Gráfico representativo da variação do índice de peróxidos de azeite da variedade Arbequina ao longo de oito meses em diferentes condições de armazenamento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

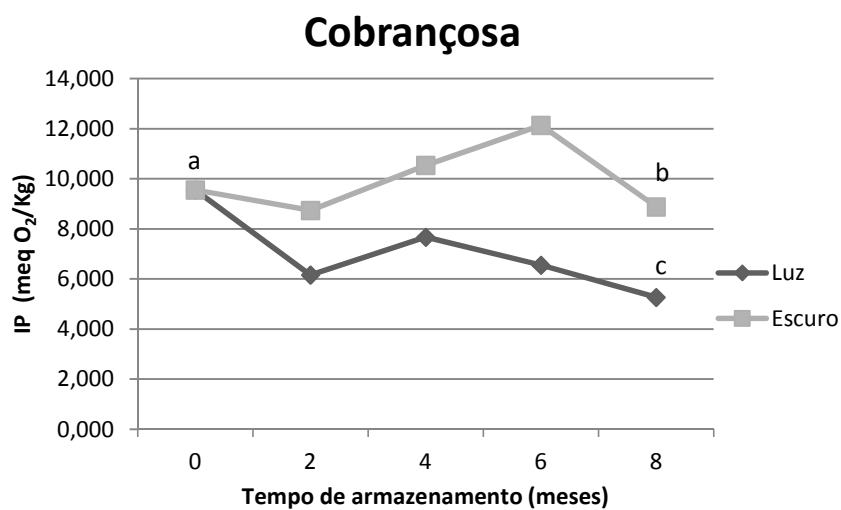


Figura 15 – Gráfico representativo da variação do índice de peróxidos de azeite da variedade Cobrançosa ao longo de oito meses em diferentes condições de armazenamento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

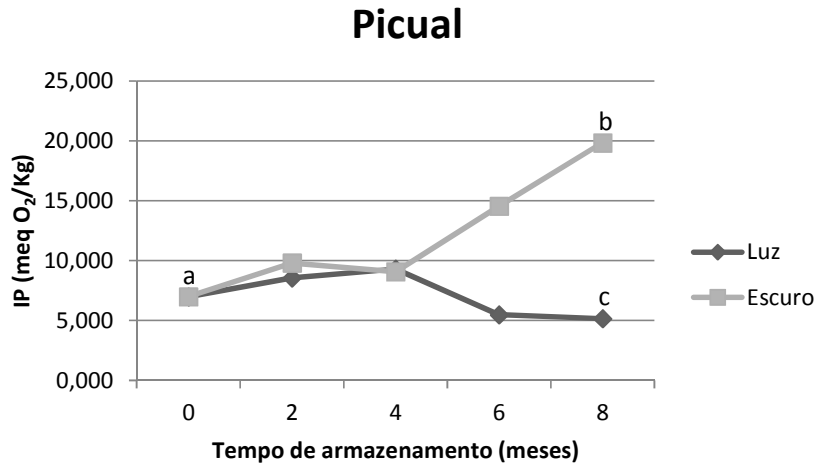


Figura 16 – Gráfico representativo da variação do índice de peróxidos de azeite da variedade Picual ao longo de oito meses em diferentes condições de armazenamento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

Através da observação das figuras 14, 15 e 16 pode verificar-se que nas diferentes condições de armazenamento em estudo (luz e escuro) os valores de IP obtidos para os vários azeites monovarietais não ultrapassam o valor legislado (≤ 20 meq O₂/Kg azeite). Inicialmente, o azeite da variedade Picual é o que apresenta o valor de IP inferior (6,99 meq O₂/Kg azeite) quando comparado com o da variedade Cobrançosa (9,55 meq O₂/Kg azeite) e Arbequina (9,77 meq O₂/Kg azeite). Estes valores são ligeiramente superiores aos descritos na literatura para azeites das variedades Picual (2,0 meq O₂/Kg azeite) e Arbequina (5,6 meq O₂/Kg azeite) cultivados na região de Almeria (Espanha) (Guil- Guerrero *et al.*, 2009). Contudo, nesse estudo é observada a mesma tendência dado que o azeite Arbequina apresenta um valor de IP superior ao da variedade Picual. Por outro lado, o valor de IP determinado para o azeite da variedade Cobrançosa é semelhante ao do descrito na literatura (Matos *et al.*, 2007). Os valores de IP são influenciados pelas variedades da azeitona, nomeadamente o amadurecimento e a estabilidade oxidativa, utilizadas para produzir o azeite.

Atendendo às figuras 14, 15 e 16 constata-se que o IP para as amostras de azeite guardadas no escuro apresenta um progressivo aumento com o tempo de armazenamento, com exceção do azeite da variedade Cobrançosa cujo valor de IP relativo aos oito meses de armazenamento se aproxima do valor de IP inicial. A

explicação para esta oscilação reside, muito provavelmente, no facto dos novos produtos de oxidação primária que se formaram nestas condições de armazenamento sofrerem uma conversão em produtos de oxidação secundária (Del Caro *et al.*, 2006). Esta tendência foi também observada em estudos desenvolvidos por Del Caro *et al.* (2006) para um azeite da variedade Bosana *cv.*.

Pelo contrário, para os azeites expostos à luz é observado um decréscimo no IP para todos os azeites monovarietais em estudo neste trabalho, o qual é mais acentuado para os azeites das variedades Arbequina e Cobrançosa.

No decurso do armazenamento em condições de escuro, em relação ao azeite Picual destaca-se uma aproximação ao valor máximo permitido (20 meq O₂/Kg azeite), sendo que aos oito meses de armazenamento o valor de IP é de 19,84 meq O₂/Kg azeite enquanto para o azeite da variedade Arbequina este teor não ultrapassa os 12 meq O₂/Kg azeite. Estatisticamente, é possível afirmar que existem diferenças significativas, nas variedades em estudo, do tempo de armazenamento inicial para o final.

Para os diferentes azeites monovarietais em estudo, decorridos os oito meses de armazenamento, constata-se que o IP determinado para as amostras armazenadas no escuro é sempre superior aos valores de IP obtidos para as amostras armazenadas na presença de luz. Esta constatação está de acordo com os resultados obtidos por outros autores que realizaram estudos sobre a influência da luz nos parâmetros químicos da qualidade de diversos azeites monovarietais (Caponio *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados experimentais obtidos pode inferir-se que os azeites armazenados no escuro sofreram um processo de oxidação primário, o que explica os valores de IP mais elevados comparativamente aos armazenados em condições de luminosidade. Por outro lado, em azeites expostos à luz ocorre fundamentalmente uma evolução de uma oxidação primária para uma secundária e, conseqüentemente, os valores de IP apresentados pelos azeites submetidos a estas condições de armazenamento são inferiores (Caponio *et al.*, 2005; Del Caro *et al.*, 2006). Assim, face às variações nos valores de IP nas condições de armazenamento estudadas pode afirmar-se que o fator luz tem uma influência significativa na oxidação dos azeites, na medida em que conduz a uma redução do período de indução do processo oxidativo (Torres *et al.*, 2006).

4.4. Índices espectrofotométricos

Como descrito anteriormente, os índices espectrofotométricos (K_{270} , K_{232} e ΔK) são parâmetros utilizados para inferir a qualidade química de um azeite. Estes parâmetros podem ser correlacionados com os resultados obtidos na determinação dos índices de peróxidos na medida em que, em ambos os ensaios, se avalia os processos oxidativos que podem ocorrer no azeite durante o seu armazenamento.

Por forma a alcançar uma maior clareza na apresentação e discussão dos resultados optou-se por apresentar gráficos ilustrativos da variação dos coeficientes K_{270} e K_{232} para os azeites monovarietais - Arbequina (Figura 17) Cobrançosa (Figura 18) e Picual (Figura 19), ao longo dos oito meses de armazenamento.

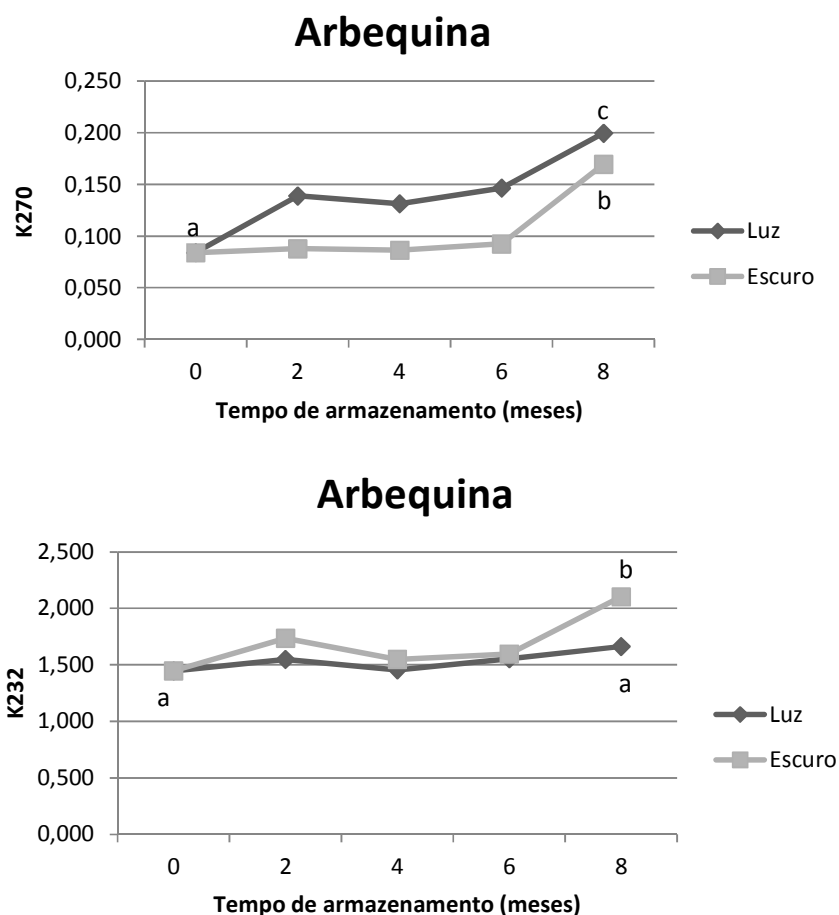


Figura 17 – Variação de K_{270} e K_{232} , para o azeite da variedade Arbequina ao longo de 8 meses de armazenamento no escuro e em presença de luz. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

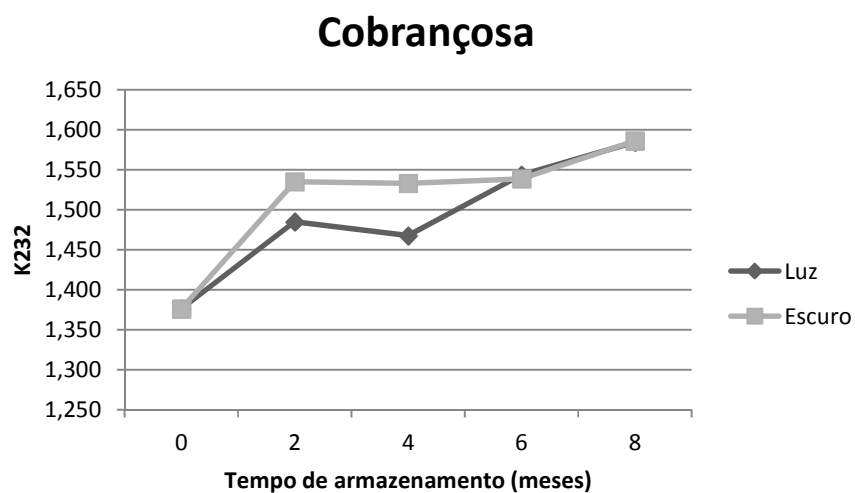
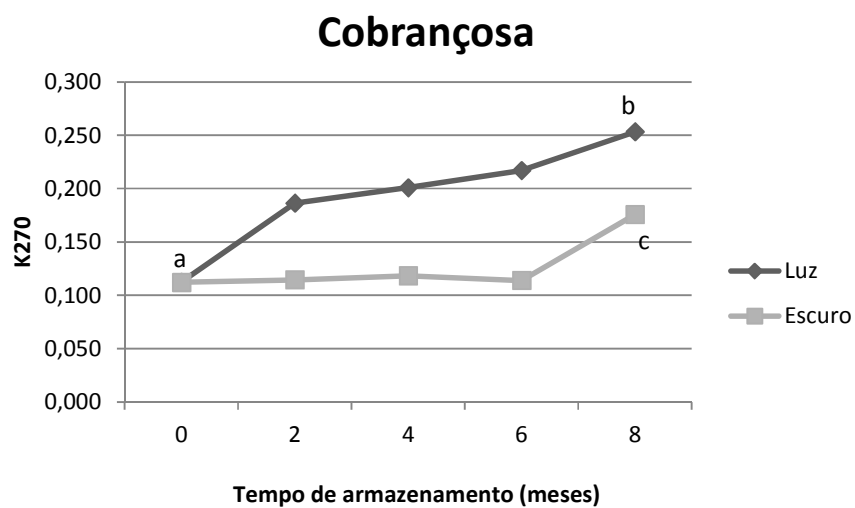


Figura 18 – Variação de K_{270} e K_{232} , para o azeite da variedade Cobrançosa ao longo de 8 meses de armazenamento no escuro e em presença de luz. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

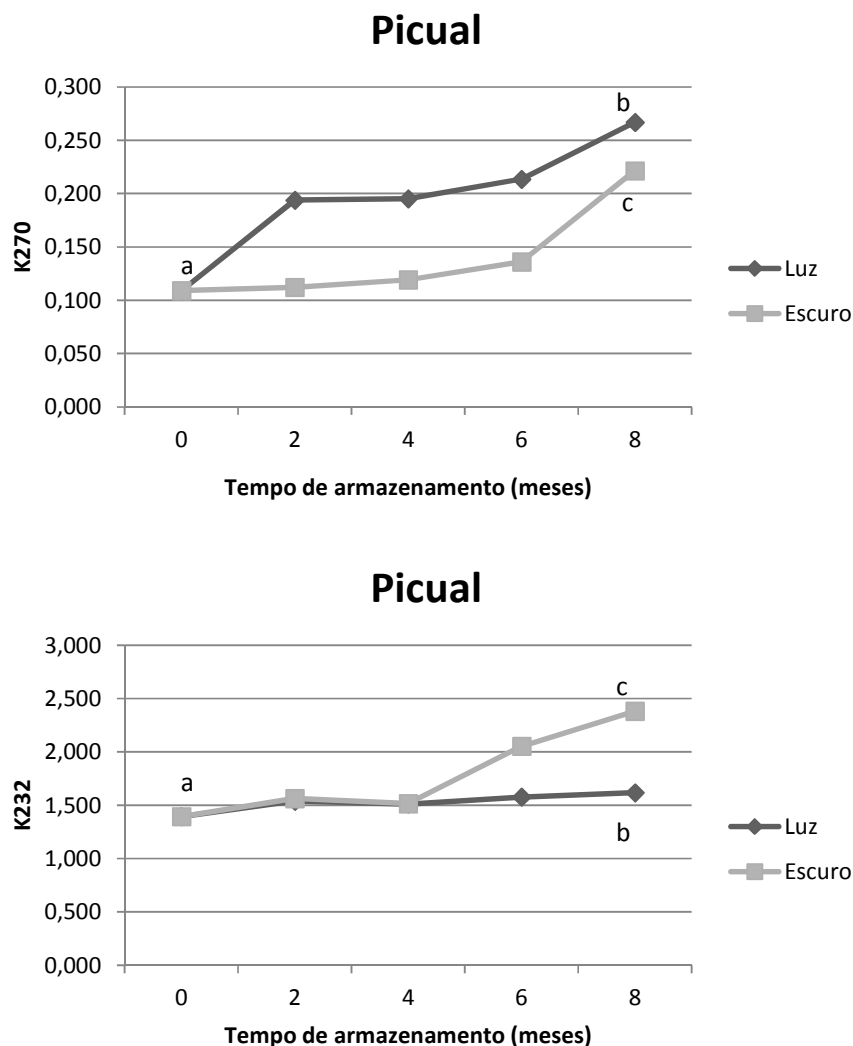


Figura 19 – Variação de K₂₇₀ e K₂₃₂, para o azeite da variedade Picual ao longo de 8 meses de armazenamento no escuro e em presença de luz. Letras diferentes denotam uma diferença significativa com nível de confiança de 95% no teste de Tukey-Kramer Multiple Comparison Test.

Como se pode observar nas figuras 17, 18 e 19 os valores obtidos do coeficiente K₂₇₀, em todos os azeites monovarietais, são inferiores ao valor máximo permitido pela legislação ($\leq 0,25$), exceto para a amostra de azeite Picual que ao oito meses de armazenamento com exposição à luz apresenta um valor de 0,27, o qual ultrapassa o limite máximo. No geral é notório, para todos os azeites monovarietais em estudo, um aumento progressivo dos valores de K₂₇₀ sendo esse acréscimo mais acentuado para os tempos finais de armazenamento (seis e oito meses de armazenamento). Da análise das

figuras 17, 18 e 19 é ainda de salientar que os valores de K_{270} obtidos são sempre inferiores para as amostras mantidas no escuro quando comparadas com as amostras expostas à luz. Esta tendência está de acordo com a observada por outros autores em estudos semelhantes (Caponio *et al.*, 2005; Kalua *et al.*, 2006, Samaniego- Sánchez *et al.*, 2012). Em concreto, o índice espectrofotométrico K_{270} encontra-se correlacionado com a presença de compostos resultantes de processos de oxidação secundária. Assim, atendendo aos resultados obtidos este processo parece ter tido um maior significado no azeite da variedade Picual. Estudos de Gutiérrez e Fernández (2002) assim como de Caponio *et al.* (2005) revelaram que o índice espectrofotométrico K_{270} é geralmente aquele que primeiro excede os limites legais admissíveis durante o armazenamento. Neste trabalho, esta situação apenas ocorreu para o azeite monovarietal da variedade Picual, aos oito meses de armazenamento, embora apenas tenha sido excedido o valor em 0,02.

No que respeita ao índice espectrofotométrico K_{232} pode verificar-se por observação das figuras 17, 18 e 19 que para as variedades Arbequina e Cobrançosa, há um aumento gradual deste índice em ambas as condições de armazenamento, sendo este aumento maior nos últimos dois meses. Relativamente à variedade Picual, este índice aumenta muito a partir do quarto mês, nas amostras armazenadas no escuro, mantendo-se praticamente constante para as amostras mantidas à luz.

É de salientar que os valores de K_{232} obtidos para as duas condições de armazenamento ao longo dos oito meses respeitam a legislação nunca ultrapassando o valor legal imposto ($K_{232} \leq 2,5$) para o azeite virgem extra, sendo que o azeite da variedade Picual e armazenado no escuro durante oito meses é aquele cujo índice K_{232} apresenta um valor mais elevado (2,382). Após análise estatística, é possível afirmar que existem diferenças significativas, nas variedades em estudo, do tempo de armazenamento inicial para o final, exceto em relação à variedade Cobrançosa para o coeficiente K_{232} .

Em relação às condições de armazenamento, decorridos os oito meses de armazenamento, as amostras guardadas no escuro apresentam valores de K_{232} mais elevados do que as expostas à luz, exceto para o azeite monovarietal da variedade Cobrançosa cujo valor de K_{232} na condição luz e escuro é muito semelhante. Resultados semelhantes foram também observados por outros autores (Kalua *et al.*, 2006)

Em suma, no que diz respeito ao estudo da variação dos índices espectrofotométricos com as condições de armazenamento estudadas, a constatação de que os valores de K_{270} aumentam significativamente durante o armazenamento em condições de exposição à luz e, atendendo a que este índice, se encontra relacionado com os produtos secundários da oxidação (fundamentalmente trienos conjugados) é possível afirmar-se que a fotooxidação é o mecanismo predominante de degradação dos azeites quando estes se encontram expostos à luz (Kalua *et al.*, 2006).

4.5. Ésteres metílicos dos ácidos gordos

A determinação do teor em ácidos gordos poderá ser um ensaio útil para avaliar a ocorrência de processos de degradação no azeite. Com esse objetivo, foi realizada a sua determinação para todos os azeites monovarietais em estudo ao longo de oito meses nas duas condições de armazenamento - luz e escuro. Contudo, para que esta determinação possa ser efetuada através da cromatografia gasosa (GC) os ácidos gordos presentes nas amostras de azeite foram previamente convertidos nos correspondentes derivados ésteres metílicos, de acordo com o descrito no procedimento experimental.

Na figura 20 encontra-se representado, a título de exemplo, o cromatograma obtido para uma amostra de azeite da variedade Picual (amostra inicial antes do armazenamento), na qual se encontram identificados os picos mais significativos.

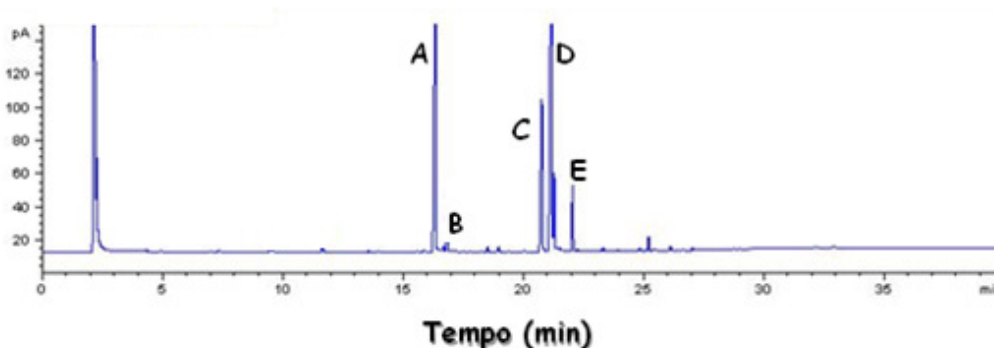


Figura 20 - Cromatograma correspondente à análise dos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes numa amostra de azeite da variedade Picual (antes do armazenamento), onde A- ácido palmítico; B- ácido palmitoleico; C- ácido esteárico; D- ácido oleico; E- ácido linoleico.

Nas tabelas 8 e 9 encontram-se sumarizados os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 8 - Composição em ácidos gordos dos azeites monovarietais estudados ao longo dos 8 meses de armazenamento em condições de armazenamento à luz (expressa em %).

Ácidos Gordos	Variedade	Luz				
		0 Meses	2 Meses	4 Meses	6 Meses	8 Meses
C16:0 Ácido Palmítico	Arbequina	12,74±0,4	12,77±0,01	12,89±0,04	12,89±0,08	12,88±0,4
	Cobrançosa	10,20±0,3	10,06±0,03	10,26±0,2	10,19±0,2	9,96±0,11
	Picual	10,06±0,06	9,02±0,04	10,21±0,3	10,57±0,2	10,27±0,1
C16:1 Ácido Palmitoléico	Arbequina	0,18±0,01	0,16±0,003	0,17±0,004	0,17±0,0003	0,16±0,01
	Cobrançosa	0,12±0,03	0,09±0,001	0,1±0,003	0,10±0,001	0,10±0,001
	Picual	0,11±0,01	0,74±0,01	0,1±0,004	0,11±0,02	0,10±0,0002
C17:0 Ácido margárico	Arbequina	1,38±0,04	1,32±0,01	1,34±0,01	1,34±0,01	1,33±0,04
	Cobrançosa	0,83±0,04	0,8±0,002	0,83±0,02	0,87±0,05	0,80±0,01
	Picual	0,82±0,005	n.d.	0,82±0,03	0,86±0,03	0,83±0,01
C17:1 Ácido margoleíco	Arbequina	0,12±0,01	0,1±0,001	0,1±0,001	0,10±0,002	0,15±0,07
	Cobrançosa	0,07±0,01	0,07±0,001	0,07±0,002	0,07±0,001	0,07±0,0002
	Picual	0,09±0,003	n.d.	0,07±0,0003	0,08±0,002	0,07±0,0002
C18:0 Ácido esteárico	Arbequina	1,83±0,01	1,83±0,05	1,81±0,07	1,86±0,04	0,93±1,3
	Cobrançosa	3,09±0,3	3,13±0,07	3,18±0,01	3,17±0,03	3,28±0,01
	Picual	3,29±0,02	3,18±0,2	3,27±0,1	2,04±0,2	3,34±0,06
C18:1 Ácido oleíco	Arbequina	69,84±0,2	70,69±0,03	70,61±0,2	70,42±0,07	69,95±2,6
	Cobrançosa	78,18±0,07	78,26±0,2	77,95±0,4	78,2±0,004	78,06±0,2
	Picual	77,96±0,08	70,17±5,48	77,77±0,3	78,58±0,08	77,65±0,3
C18:2 Ácido linoleíco	Arbequina	11,25±0,05	10,87±0,02	10,82±0,02	10,79±0,003	6,93±5,9
	Cobrançosa	4,63±0,02	4,64±0,01	4,76±0,2	4,62±0,03	4,62±0,005
	Picual	4,76±0,003	4,75±0,3	4,73±0,01	4,85±0,03	4,74±0,001
C20:0 Ácido araquídico	Arbequina	0,70±0,004	0,67±0,00005	0,65±0,04	0,66±0,001	5,8±7,3
	Cobrançosa	0,80±0,003	0,81±0,005	0,79±0,01	0,80±0,001	0,81±0,0003
	Picual	0,79±0,004	0,73±0,004	0,8±0,01	0,80±0,03	0,81±0,003
C20:1 Ácido gadoleíco	Arbequina	0,43±0,001	0,45±0,005	0,45±0,02	0,44±0,001	0,54±0,2
	Cobrançosa	0,48±0,01	0,48±0,02	0,48±0,02	0,47±0,02	0,50±0,05
	Picual	0,50±0,009	0,73±0,2	0,48±0,03	0,49±0,004	0,49±0,005
C18:3 Ácido linolénico	Arbequina	0,38±0,01	0,35±0,02	0,37±0,01	0,36±0,002	0,38±0,06
	Cobrançosa	0,30±0,01	0,28±0,03	0,29±0,004	0,29±0,01	0,30±0,01
	Picual	0,30±0,002	0,31±0,03	0,29±0,01	0,30±0,01	0,29±0,002
C20:4 Ácido araquidónico	Arbequina	0,43±0,2	0,15±0,004	0,15±0,01	0,23±0,03	0,25±0,1
	Cobrançosa	0,21±0,2	0,14±0,003	0,14±0,01	0,13±0,003	0,15±0,03
	Picual	0,14±0,004	2,52±1,0	0,19±0,06	0,14±0,01	0,14±0,2
C24:0 Ácido lignocérico	Arbequina	0,08±0,003	0,06±0,01	0,07±0,005	0,14±0,05	0,11±0,06
	Cobrançosa	0,08±0,01	0,06±0,001	0,13±0,08	0,09±0,04	0,09±0,03
	Picual	0,09±0,005	1,69±0,7	0,22±0,1	0,10±0,01	0,11±0,1

Legenda: n.d. – não detetado

Tabela 9 - Composição em ácidos gordos dos azeites monovarietais estudados ao longo dos 8 meses de armazenamento nas diferentes condições de armazenamento no escuro (expressa em %).

Ácidos	Variedade	Escuro				
		Gordos	0 Meses	2 Meses	4 Meses	6 Meses
C16:0 Ácido Palmítico	Arbequina	12,74±0,4	12,43±0,1	13,10±0,07	13,43±0,9	12,62±0,06
	Cobrançosa	10,20±0,3	9,58±0,01	9,94±0,04	10,43±0,4	10,24±0,04
	Picual	10,06±0,06	9,83±0,4	9,79±0,05	10,28±0,3	10,35±0,01
C16:1 Ácido Palmitoleico	Arbequina	0,18±0,01	0,17±0,005	0,17±0,01	0,17±0,01	0,16±0,01
	Cobrançosa	0,12±0,03	0,09±0,003	0,09±0,002	0,10±0,002	0,10±0,001
	Picual	0,11±0,01	0,09±0,03	0,09±0,002	0,10±0,002	0,10±0,00004
C17:0 Ácido margárico	Arbequina	1,38±0,04	1,3±0,02	1,36±0,01	1,39±0,09	1,3±0,02
	Cobrançosa	0,83±0,04	0,77±0,002	0,79±0,0005	0,84±0,03	0,82±0,004
	Picual	0,82±0,005	0,79±0,03	0,78±0,005	0,82±0,02	0,83±0,001
C17:1 Ácido margoleico	Arbequina	0,12±0,01	0,1±0,00001	0,10±0,002	0,1±0,003	0,09±0,002
	Cobrançosa	0,07±0,01	0,07±0,01	0,07±0,0005	0,07±0,0004	0,07±0,0001
	Picual	0,09±0,003	0,07±0,002	0,07±0,001	0,08±0,002	0,07±0,001
C18:0 Ácido esteárico	Arbequina	1,83±0,01	1,86±0,01	1,52±0,2	1,86±0,2	1,86±0,01
	Cobrançosa	3,09±0,3	3,13±0,09	3,1±0,3	2,80±0,8	3,27±0,01
	Picual	3,29±0,02	3,24±0,08	3,33±0,02	3,18±0,2	3,32±0,0003
C18:1 Ácido oleico	Arbequina	69,84±0,2	70,36±0,4	70,61±0,3	69,46±1,9	69,37±1,80
	Cobrançosa	78,18±0,07	74,47±2,22	78,37±0,3	78,21±0,3	77,81±0,07
	Picual	77,96±0,08	77,69±0,6	77,97±0,2	78,05±0,05	77,72±0,09
C18:2 Ácido linoleico	Arbequina	11,25±0,05	10,91±0,02	10,88±0,02	11,20±0,4	6,82±5,6
	Cobrançosa	4,63±0,02	4,65±0,04	4,62±0,04	4,68±0,07	4,61±0,004
	Picual	4,76±0,003	4,83±0,03	4,73±0,03	4,70±0,01	4,67±0,01
C20:0 Ácido araquídico	Arbequina	0,70±0,004	0,68±0,01	0,66±0,03	0,67±0,06	5,75±7,2
	Cobrançosa	0,80±0,003	0,78±0,02	0,80±0,001	0,79±0,01	0,80±0,003
	Picual	0,79±0,004	0,41±0,6	0,80±0,003	0,76±0,03	0,77±0,001
C20:1 Ácido gadoleico	Arbequina	0,43±0,001	0,45±0,01	0,42±0,01	0,46±0,03	0,54±0,1
	Cobrançosa	0,48±0,01	0,56±0,1	0,51±0,01	0,48±0,01	0,48±0,01
	Picual	0,50±0,009	0,55±0,08	0,52±0,01	0,47±0,02	0,48±0,0001
C18:3 Ácido linolénico	Arbequina	0,38±0,01	0,36±0,03	0,36±0,001	0,35±0,04	0,40±0,05
	Cobrançosa	0,30±0,01	0,32±0,1	0,30±0,01	0,30±0,01	0,29±0,005
	Picual	0,30±0,002	0,3±0,04	0,30±0,002	0,27±0,04	0,29±0,001
C20:4 Ácido araquidónico	Arbequina	0,43±0,2	0,14±0,02	0,14±0,004	0,21±0,1	0,30±0,05
	Cobrançosa	0,21±0,2	0,14±0,01	0,16±0,03	0,15±0,03	0,19±0,03
	Picual	0,14±0,004	0,17±0,004	0,25±0,1	0,14±0,02	0,10±0,07
C24:0 Ácido lignocérico	Arbequina	0,08±0,003	0,30±0,3	0,08±0,01	0,08±0,002	0,12±0,06
	Cobrançosa	0,08±0,01	1,06±0,4	0,15±0,1	0,07±0,01	0,10±0,03
	Picual	0,09±0,005	0,09±0,003	0,18±0,1	0,09±0,01	0,57±0,8

Por observação das tabelas 8 e 9, é notório que o derivado éster metílico do ácido oleico é o que apresenta o teor mais elevado nos azeites monovarietais em estudo variando no intervalo 69,84% - 78,18%, sendo que estes valores se encontram no intervalo de concentrações impostos pela legislação (55,0% - 83,0%). É ainda de salientar que o azeite da variedade Cobrançosa é aquele que apresenta um teor no derivado éster metílico do ácido oleico mais elevado (78,18%). Os azeites das variedades Picual e Arbequina apresentam teores deste composto de 77,96% e 69,84%, respetivamente. Estes valores estão de acordo com os descritos na literatura por outros autores (Guil-Guerrero e Urda- Romacho, 2009).

No que diz respeito aos derivados ésteres dos ácidos gordos polinsaturados, nomeadamente o derivado do ácido linoleico, o azeite da variedade Arbequina é o que apresenta teores mais elevados neste composto, no tempo inicial (11,25%) enquanto os azeites das variedades Cobrançosa e Picual revelaram valores inferiores mas muito semelhantes de 4,63% e 4,76%, respetivamente. Por observação da tabela 8 é possível inferir-se que para o azeite da variedade Arbequina o teor do derivado éster metílico do ácido linoleico decresce para cerca de metade, decorridos os oito meses de armazenamento, tanto na presença de luz como no escuro. No entanto, nos outros dois azeites monovarietais em estudo não foi observada esta tendência. Os trabalhos de Guil-Guerrero e Urda - Romacho (2009) com azeites monovarietais das variedades Picual, Hojiblanca e Arbequina em diferentes condições de armazenamento (depósito/garrafa) evidenciaram um decréscimo no teor do derivado éster metílico do ácido linoleico, o qual é atribuído a processos de degradação originando, conseqüentemente um incremento no teor do derivado éster metílico do ácido oleico. Este último efeito não foi observado no presente trabalho pois a concentração do derivado éster metílico do ácido oleico permaneceu inalterada com o armazenamento, quer nos azeites expostos à luz quer naqueles que foram guardados no escuro.

Relativamente aos teores dos restantes derivados éster metílico dos ácidos gordos, pode constatar-se que os respetivos derivados dos ácidos palmitoleico, heptadecanóico e araquídico apresentam valores ligeiramente mais elevados do que os estipulados pela legislação.

Em geral, a composição em ácidos gordos dos diferentes azeites monovarietais utilizados no presente estudo não sofre grandes variações ao longo dos oito meses de

armazenamento, em condições de luz e escuro, como se pode verificar pela análise das tabelas 8 e 9.

4.6. Tocoferóis

Como referido anteriormente, os tocoferóis, apesar de serem componentes minoritários do azeite, desempenham um papel bastante relevante pois contribuem para a sua estabilidade, sendo considerados ótimos antioxidantes naturais, inibindo a ocorrência de processos oxidativos no azeite prevenindo, deste modo, a oxidação dos ácidos gordos insaturados (Ramalho e Jorge, 2006). Assim, atendendo a estas constatações pode ser considerado interessante e pertinente a quantificação dos teores deste composto bem como a possibilidade de avaliar a variação da sua concentração quando o azeite é submetido a diferentes condições de armazenamento.

No presente trabalho, apenas se estudou a variação do teor em α - tocoferol para os diferentes azeites monovarietais em estudo nas duas condições de armazenamento- luz e escuro, uma vez que de entre os tocoferóis presentes no azeite, este isómero é o componente maioritário sendo também aquele que apresenta um potencial biológico como antioxidantes mais elevado ($\delta < \gamma < \beta < \alpha$) (Ramalho e Jorge, 2006).

Na figura 21 encontra-se representado o cromatograma de HPLC obtido correspondente à análise de α -tocoferol para uma amostra de azeite Picual (antes do armazenamento). É de referir que nesta figura pode ser visualizado o espectro de UV-Vis correspondente ao analito em estudo (α -tocoferol) e que permite identificar o composto mediante comparação dos comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorvância com os obtidos para o padrão disponível comercialmente.

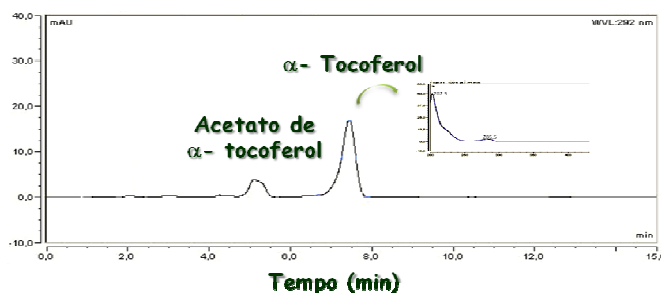


Figura 21- Cromatograma de HPLC correspondente à análise de α -tocoferol numa amostra de azeite Picual (antes do armazenamento).

Tal como descrito no procedimento experimental, a quantificação do α -tocoferol foi efetuada recorrendo ao método do padrão interno tendo sido, previamente, necessário proceder ao traçado de uma curva de calibração para este composto. Com os dados obtidos foi possível proceder-se ao traçado da curva de calibração, a qual se apresenta na figura 22, onde o eixo das ordenadas corresponde aos valores do quociente entre as áreas do pico do analito e do pico do padrão interno (A/A_{PI}) e o eixo das abcissas aos valores da concentração das soluções do analito. É de referir que o coeficiente de correlação da recta (R^2) é elevado, atestando a linearidade da curva na gama de concentrações estudada (0,005- 0,025 mg/L).

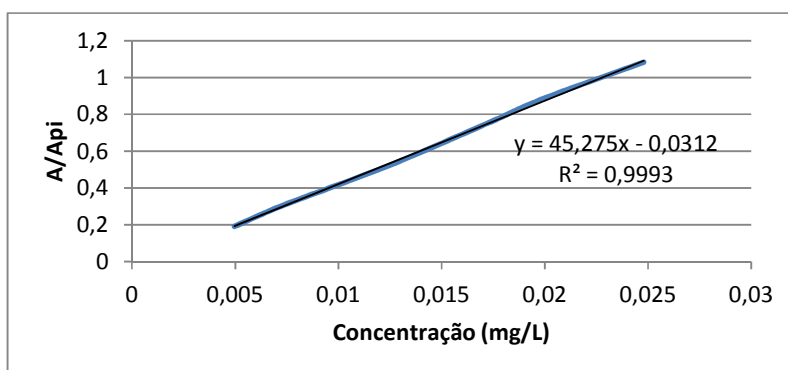


Figura 22 - Curva de calibração para a determinação da concentração de α -tocoferol nos azeites em estudo.

A análise por HPLC das amostras de azeite em estudo ao longo de oito meses e em diferentes condições de armazenamento permite a obtenção de cromatogramas com perfis cromatográficos semelhantes aos apresentado na figura 21, sendo possível determinar o valor das áreas correspondentes ao analito em estudo e ao padrão interno. O cálculo da razão A/A_{PI} e por interpolação na equação da curva de calibração referida anteriormente (Figura 22) é possível determinar o valor da concentração de α -tocoferol presente em cada uma das amostras. Na tabela 10 encontra-se sumariada a informação obtida neste estudo.

Tabela 10 – Concentração de α -tocoferol nas diversas amostras de azeites monovarietais em estudo ao longo de 8 meses em condições de armazenamento de luz e de escuro (expressa em mg/Kg azeite)

Variedade	Luz				Escuro			
	0 Meses	2 Meses	6 Meses	8 Meses	0 Meses	2 Meses	6 Meses	8 Meses
Arbequina	102,74±8,6	137,71±7,9	128,99±12,3	118,77±10,1	102,74±8,6	175,60±47,7	164,17±5,1	136,57±41,4
Cobrançosa	113,66±5,3	149,73±0,95	132,91±12,0	134,42±22,2	113,66±5,3	211,34±44,9	191,66±39,5	140,47±10,2
Picual	184,31±31,8	128,32±11,4	128,32±15,8	126,32±20,9	184,31±31,8	297,67±42,40	192,36±14,5	181,97±42,3

Por observação da tabela 10 pode constatar-se que os valores de α -tocoferol para os azeites monovarietais em estudo se encontram na gama de concentrações do descrito na literatura, sendo que o teor deste composto é influenciado pela espécie varietal (Pereira *et al.*, 2002)

A análise dos resultados sumarizados na tabela 10 permite concluir que existe um aumento do teor em α -tocoferol durante os oito meses de armazenamento, na luz e no escuro, para os azeites das variedades Arbequina e Cobrançosa. Pelo contrário, para o azeite da variedade Picual o valor da concentração para o α - tocoferol decresce durante o armazenamento do azeite exposto à luz.

De acordo com a literatura, alguns componentes minoritários, nos quais se incluem os tocoferóis, os carotenóides e as clorofilas diminuem significativamente com o armazenamento (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Kanavouras e Coutelieres, 2006). No entanto, esta tendência só foi observada neste trabalho para o azeite da variedade Picual.

5. CONCLUSÃO

O azeite é considerado como um principais constituintes da dieta mediterrânica e assume em Portugal um crescente interesse sócio-económico. Atendendo a que as condições de armazenamento podem condicionar significativamente a qualidade deste produto alimentar podendo, inclusivamente em determinadas condições, comprometer as suas propriedades organoléticas e sensoriais reveste-se de extrema importância esclarecer em que medida o efeito do parâmetro luz pode ter influência na qualidade do azeite.

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que em relação à acidez, apesar das alterações, pois há uma diminuição do teor de acidez em todas as variedades, este nunca ultrapassa o valor legislado, sendo até bastante inferior.

No que respeita ao teor de polifenóis, há uma ligeira diminuição deste teor, tal como esperado resultante dos processos oxidativos que ocorrem. Por sua vez o índice de peróxidos para o azeite da variedade Arbequina aumenta na presença de luz e diminui no escuro, ao contrário do que acontece com a variedade Picual. Este teor para a variedade Cobrançosa apresenta uma diminuição tanto à luz como no escuro em relação ao valor inicial.

Relativamente aos índices espectrofotométricos que nos indicam a medida dos produtos primários (K_{232}) e secundários (K_{270}) da oxidação, para o coeficiente K_{232} os valores são mais elevados no escuro do que em presença da luz. Para K_{270} os valores aumentam em presença de luz o que significa que esta pode acelerar o processo oxidativo.

Em relação aos ácidos gordos não houve alterações significativas, segundo Aparicio *et al.*, 1999, a natureza dos ácidos gordos presentes nas azeitonas é uma das responsáveis pela elevada estabilidade do azeite.

No que respeita ao teor de α – tocoferol só para a variedade Picual é que ocorreu um ligeiro decréscimo, ao longo do tempo de armazenamento.

Na literatura é consensual que nos azeites armazenados no escuro encontram-se fundamentalmente produtos resultantes de oxidação primária enquanto nos azeites expostos à luz surgem os produtos secundários da oxidação (Torres e Maestri, 2006).

Estudos desenvolvidos por Pagliarini *et al.* (2000) em azeite virgem extra da Toscana indicaram que a estabilidade não é influenciada pelos métodos de engarrafamento, pelas condições de transporte e armazenamento nos supermercados.

No decorrer deste estudo, foi visível uma modificação bastante significativa ao nível da coloração do azeite exposto à luz as quais, de acordo com a literatura (Pristouri *et al.*, 2010) encontram-se relacionadas com a decomposição das clorofilas influenciada pelo processo de fotooxidação. Daí que talvez fosse pertinente estender este estudo à avaliação da variação dos teores deste tipo de compostos.

Na minha opinião se o presente estudo tivesse sido alargado a um maior tempo de armazenamento, doze a dezoito meses, possivelmente as variações dos diferentes parâmetros em estudo seriam mais significativas, pois este é considerado como o período máximo de armazenamento do azeite virgem extra até ao seu consumo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angerosa F, Basti C, Vito R. (1999). Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *J Agric Food Chem*, 47 (3), 836-839.

Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro GF., (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with quality. *J Chromatogr A*. Vol. 1054, 17–31.

Aparício, R.; Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Aparicio R., Roda L., Albi M.A., Gutiérrez F. (1999) “Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat” *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4150- 4155.

Azadmard-Damirchi, S., Dutta, P.C. (2006), Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, 1108, 183.

Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G, Zarrouk M, Ben Miled DD, (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* 109, 743–754.

Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2008) El cultivo del olivo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 6ªEdição, Cap. 3: 67-77.

Boskou D. “Olive Oil Minor Constituents and Health”, (2009). CRC Press, Boca Raton (Chapter 3: Boskou D., “Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil”, pp. 11- 44, Chapter 4: “Other Important Minor Constituents”, pp. 45- 54.)

BOSKOU, D. (2007). **Olive Oil**. In More on Mediterranean Diets. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Vol. 97. Ed. Simopoulos, A. P. & Visioli, F.; Karger, Basel, 180-181. ISBN: 3805582196.

Boskou, D., (1998) em Química y Tecnología del Aceite de Oliva (Editado por Boskou, D., Mundi Prensa Libros, S.A., Madrid, Espanha), Cap. 1-3.

Caponio, F., Bilancia, M., Pasqualone, A., Sikorska, E., Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *Eur. Food Res Technol* , 221:92–98.

Cecchi, T., Passamonti, P., Cecchi, P. (2010). Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. *Food Chemistry*, 120, 730-735.

Chen H., Angiuli M., Ferrari C., Tombari E., Salvetti G., Bramanti E. (2011) Tocopherol speciation as first screening for the assessment of extra virgin olive oil quality by reversed-phase high performance liquid chromatography/fluorescence detector, *Food Chemistry*, 125, 1423- 1429.

COI – International Olive Council. Trade Standard Applying to Olive Oils and Olivepomace Oils. COI / T.15 / NC no. 3 / Rev. 3, November 2008.

Codex STAN 33 - Norma del Codex para los Aceites de Oliva y los Aceites de Orujo de Aceituna (URL www.codexalimentarius.net, consultado Janeiro de 2007).

Cunha, S. (2007) - Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas. Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. Dissertação de doutoramento. Faculdade de farmácia, Universidade do Porto.

Custódio, T. (2009) - Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade. Dissertação de mestrado. Faculdade de farmácia, Universidade do Porto.

Del Caro A., Vacca V., Poiana M., Fenu P., Piga A. (2006) “Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits” *Food Chem.*, 98, 311- 316.

Dias. S. (2009). Pasta de azeite versus azeite virgem extra. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Dionisi, F., Prodolliet, J., Tagliaferri, E., (1995). Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high performance liquid chromatography/amperometric detection of tocopherols and tocotrienols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1505.

- Fadda C., Del Caro A., Sanguinetti A.M., Urgeghe P.P., Vacca V., Arca P.P., Piga A. (2012) “Changes during storage of quality parameters and *in vitro* antioxidante activity of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction Technologies”, *Food Chem.*, 134, 1542- 1548.
- Fernández, M.H.; Ojeda, M.; Rodríguez, A.; Bernardino, J.; Ruiz, L.; García, A. (1991). Elaboracion de aceite de oliva de calidad. Junta de Andalucía, Direcccion General de Investigacion, Tecnología e Formation Agroalimentaria y Pesquera, 5/91 Apuntes. Sevilha.
- Frankel E.N. (2010) “Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants”, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5991- 6006.
- Gallardo-Guerrero L., Gandul- Rojas B., Roca M., Mínguez-Mosquera M. (2005) “Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82, 33- 39.
- García A., Brenes M., García P., Romero C., Garrido A. (2003) “Phenolic content of comercial olive oils”, *Eur Food Res Technol*, 216, 520- 525.
- Garcia, E., Luh, B.S., Martin, M.H., (2005). Processing Fruits Science and Technology (Editado por Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H., CRC Press, Florida, Estados Unidos), Cap. 31.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela- Raventós, R.M., La Torre, M. C., Lopéz-Sabater, M. C. (2000), *Journal of chromatografy A*, 881, 251-254.
- Gómez- Alonso S., Mancebo- Campos V., Salvador M.D., Fregapane G. (2007) “Evolution of major and minor componentes and oxidation indexes of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature”, *Food Chem.*, 100, 36- 42.
- Gouveia, J.M.N.B. (2002). *Historia da Cultura Olivícola e Oleícola em Portugal. O Azeite em Portugal*, Edições Inapa.
- Gouveia, J. M. B. (1995). *Azeites Virgens do Alto Alentejo – Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial*. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Granados, J. A. (2000). Enciclopedia del Aceite de Oliva, Historia y Leyendas del aceite y la Aceituna. Editorial Planeta, Barcelona, 109-114; 357-372. ISBN: 84-08-03542-8.

- Guil-Guerrero J.L., Urda- Romacho J. (2009) "Quality of extra virgin olive oil affected by several packaging variables", *Grasas Y Aceites*, 60, 2, 125- 133.

Gutiérrez F., Fernández J.L. (2002). Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond Which the Oil Is No Longer of "Extra" "Quality", *J. Agric. Food Chem.*, 50, 571- 577.

Kalua CM., Allen MS., Bedgood Jr DR., Bishop AG., Prenzler PD., Robards K.(2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chemistry* 100, 273–286.

Kalua C.M., Bedgood D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D. (2006) "Discrimination of Storage Conditions and Freshness in Virgin Olive Oil" *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7144-7151.

Kanavouras A., Coutelieris F.A. (2006) "Shelf- life predictions for packaged olive oil based on simulations", *Food Chem.*, 96, 48- 55

Kiritsakis, A. (1993). Química del Aroma del Aceite de Oliva. *Olivae*, revista do Conselho Oleícola Internacional, Madrid, nº 45: 28-33.

Kiritsakis, A. (1992). El Aceite de Oliva. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid, 45-76; 77-82; 83-102; 131-156; 157-162; 163-180, ISBN: 84-87440-28-2.

Kochhar, S. P. (1993). Oxidative Pathways to the Formation of Off-Flavours. *In Food taints and off-flavours*. Ed. Saxby, M. J.; Chapman & Hall, London, 168-225. ISBN: 0-7514- 0263-X.

Maia, L.M.J., (2007). Avaliação dos Carotenoides Maioritários em Azeites, Dissertação de candidatura ao grau de Mestre Faculdade de Farmácia, Universidade de Porto.

Marco Gomes Da Silva, Ana Maria Costa Freitas, Maria João Bastos Cabrita and Raquel Garcia. (2011) "Oil composition, volatiles" *In Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. ISBN 978-953-307-921-9 Edited by Boskou Dimitrios, Publisher InTech

- Matos L.C., Pereira J.A., Andrade P.B., Seabra R.M., Oliveira M.B.P.P. (2007) "Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils", *Food Chem.*, 102, 976- 983.
- Méndez A.I., Falqué E. (2007) Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil, *Food Control*, 18 521- 529.
- Messina V., Biolatto A., Descalzo A., Sancho A., Baby R., Walsøe de Reca N. (2009) "Effect of light on odour profile, volatile compounds and vitamins of extra-virgin olive oil" *CyTA- Journal of Food*, 7, 1, 59- 66.
- Montealegre C., Alegre M.L.M., García- Ruiz C. (2010) "Traceability Markers to the Botanical Origin in Olive Oils", *J. Agric. Food Chem*, 58, 28-38.
- Morales, M. A. & Przybylski, R. (2000). Olive Oil Oxidation. *In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties*. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 459-490. ISBN: 0-8342-1633-7.
- Morelló, J. R.; Motilva, M. J.; Tovar, M. J.; Romero, M. P. (2004). *Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on phenolic fraction*. *Food Chemistry* 85, 357-364.
- Nawar, W. W. (1997). Biochemical Processes: Lipid Instability. *In Food Storage Stability*. Ed. Taub, I. A. & Singh, R. P.; CRC Press, Boca Raton, 92-93. ISBN: 0-8493-2646-X.
- Pagliarini E., Zanoni B., Giovanelli G. (2000) "Predictive Study on Tuscan Extra Virgin Olive Oil Stability under Several Commercial Conditions", *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1345- 1351.
- Pereira, J.A., Casal, S., Bento, A., Oliveira, M.B.P.P., (2002). Influence of olive storage period on oil quality of three portuguese cultivars of *Olea europea*, Cobrancosa, Madural, and Verdeal Transmontana, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6335.
- Piironen, V., Lampi, A-M, (2004). Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals (Editado por Dutta, P.C., Marcel Dekker Inc., Nova York, Estados Unidos), Cap. 1.

Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A., Review. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 939.

Pokorny, J., Parkanyiova, L., (2003). Chemical and Functional Properties of Food Lipids (Editado Sikorski, Z., Kołakowska, A., *CRC Press*, Nova York, Estados Unidos), Cap. 11.

Pristouri G., Badeka A., Kontominas M.G. (2010) “Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil”, *Food Control*, 21, 412- 418.

Ramalho V.C., Jorge N. (2006) Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. *Química Nova*, 29, 4, 755- 760.

Regulamento (CE) n.º 1989/2003 da Comissão, de 6 de Novembro de 2003, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo as características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.

Regulamento (CE) n.º 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004.

Saldanha, M. H. (1999). Benefícios do azeite na saúde humana. Direção Geral de Desenvolvimento Rural, Lisboa.

Samaniego-Sánchez C., Oliveras-Lopez M.J., Quesados- Granados J.J., Villalón- Mir M., López- G^a Serrana H. (2012) “Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions”, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 194- 204.

Sánchez-Ortiz A, Romero C, Prez A, Sanz C. (2008). Oxygen concentration affects volatile compound biosynthesis during virgin olive oil production *J. Agric. Food Chem.* 56 (12), 4681-4685.

Santos, M. (2009). A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento. Dissertação de mestrado para a obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Torres M.M., Maestri D.M. (2006) “Chemical Composition of Arbequina Virgin Olive Oil in relation to extraction and Storage Conditions”, *J. Sci Food Agric*, 86, 2311- 2317.

Tous J., R o, C.D., Cabalhero, J.M. e Rallo L. (2005). Libro Segundo: Variabilidad y Selecci n in Rallo L., Barranco D., Caballero J.M., R o C.D., Mart n A. Tous J. Trujillo I. (eds.) Variedades del Olivo en Espa a, pp 233-395. Ed. Junta de Anadaluc a, Consejer a de Agricultura e Pesca, Miniterio de Agricultura, Pesca y Alimentaci n, Mundi-Prensa, Madrid.

Vichi S., Pizzale L., Conte L., Buxaderas S., Lopez-Tamames E., (2003). Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status *J Agric Food Chem*, 51, 6564-6571.

Vekiari S.A., Papadopoulou P., Kiritsakis A. (2007) "Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes", *Grasas y Aceites* 58, 237- 242.

Velasco, J.; Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgen olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104 : 661-676.

Villalta, L. (1999). Obtenci n del aceite de oliva virgen – 2^a Edicion, Editorial Agr cola Espa ola, S.A.. Madrid.

<http://www.sovenagroup.com/pt/group/produtos/azeite/tipos/portugal>