



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Azeites em modo de produção integrada e biológico: explorar
uma estratégia para a sua diferenciação e valorização**

Ana Mafalda Pereira Coutinho Ferreira Brilhante

Orientador(es) | Raquel Marta Garcia

Maria João Cabrita

Évora 2023



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Azeites em modo de produção integrada e biológico: explorar
uma estratégia para a sua diferenciação e valorização**

Ana Mafalda Pereira Coutinho Ferreira Brilhante

Orientador(es) | Raquel Marta Garcia
Maria João Cabrita

Évora 2023



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Cristina Barrocas Dias (Universidade de Évora) (Arguente)
Raquel Marta Garcia (Universidade de Évora) (Orientador)

Dedicatória

Aos meus pais e à minha avó, Aurélia

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Doutora Raquel Garcia, por todo o apoio, carinho e disponibilidade. Sem a sua ajuda, não teria sido possível a realização e conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Maria João Cabrita, que se mostrou sempre disponível em ajudar-me, mesmo à última da hora.

Ao Esporão, em especial, à Engenheira Ana Carrilho e à Engenheira Ana Gaspar, que de boa vontade disponibilizaram os azeites.

Ao Nuno, que me orientou durante o processo de análise dos resultados e em todos os momentos em que necessitei de esclarecer dúvidas.

Ao Rui e à D. Albina, que me auxiliaram durante o tempo que estive no laboratório de enologia.

Aos meus pais, António e Ana Paula, que viram as dificuldades que tive e que me incentivaram sempre a continuar.

À minha avó, Aurélia, que durante este ano partiu, mas que sempre foi e sempre será a referência de resiliência nesta família.

À minha tia, Manuela, que sempre se preocupou comigo.

Ao André, que esteve sempre de braços abertos, para me confortar nos dias mais complicados.

À minha amiga Inês, que me mostrou que nada é impossível e que demore o tempo que demorar, nunca devemos desistir.

Por fim e para não me esquecer de ninguém, um enorme obrigada a todos os que tiraram um bocadinho para me ajudar durante este processo e sem os quais, não seria possível concluir esta etapa.

“Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei e sou muito das coisas que gostei”

Antoine de Saint-Exupéry, in “O Príncipezinho”

Resumo

O modo de produção biológico, integrado e convencional é uma temática que envolve questões relacionadas com a sustentabilidade ambiental, económica e de saúde humana. Já foram realizados alguns estudos numa tentativa de diferenciar azeites de produção biológica de azeites de produção convencional. Contudo, estudos focados na diferenciação de azeites biológicos e de produção integrada, são escassos. O trabalho focou-se na avaliação do perfil volátil dos azeites obtidos em dois modos de produção (biológico e integrada), e foi estudada a sua utilidade na diferenciação destes azeites. Foram analisados azeites das variedades Cobrançosa, Galega e Arbequina, no que diz respeito aos parâmetros químicos da qualidade e composição volátil, utilizando uma técnica cromatográfica de separação e identificação, pouco aplicada a esta temática - GC-ToFMS.

Foram identificados os compostos: 4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene, 1-Nonanol, α -Farnesene e Álcool fenilético que poderão ser potenciais candidatos a “compostos marcadores” para a diferenciação dos azeites em estudo.

Palavras-chave: Azeite; Virgem extra; Biológico; Integrada; Compostos voláteis

Integrated production versus organic olive oils: exploring a strategy for their differentiation and valorization

Abstract

The biological, integrated and conventional mode of production is a theme that involves issues related to environmental, economic and human health sustainability. Some studies have already been carried out in an attempt to differentiate organically produced olive oils from conventionally produced olive oils. However, studies focused on differentiating organic and integrated production olive oils are scarce. The work focused on evaluating the volatile profile of olive oils obtained in two production methods (biological and integrated), and their usefulness in differentiating these oils was studied. Olive oils from the Cobrançosa, Galega and Arbequina varieties were analyzed with regard to the chemical parameters of quality and volatile composition, using a chromatographic separation and identification technique, little applied to this topic - GC-ToFMS.

The following compounds were identified: 4,8-Dimethylnone-1,3,7-triene, 1-Nonanol, α -Farnesene and Phenylethyl alcohol, which could be potential candidates for “marker compounds” for the differentiation of olive oils under study.

Keywords: Oil; Extra virgin; Organic; Integrated; Volatile compounds

Índice Geral

Índice de Tabelas.....	X
Índice de Figuras	XI
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. O Setor oleícola	5
2.1.1. Panorama Mundial	5
2.1.2. Produção em Portugal.....	7
2.1.3. Consumo de azeite	8
2.2. O Azeite	10
2.2.1. Um pouco sobre a história da oliveira e do azeite	10
2.2.2. Composição química do azeite.....	11
2.2.2.1. Fracção Saponificável	11
2.2.2.1.1. Triacilgliceróis.....	12
2.2.2.1.2. Fosfolípidos	13
2.2.2.2. Fracção Insaponificável	13
2.2.2.2.1. Ceras.....	13
2.2.2.2.2. Álcoois alifáticos.....	14
2.2.2.2.3. Hidrocarbonetos.....	14
2.2.2.2.4. Polifenóis	15
2.2.2.3. Compostos voláteis	15
2.2.2.3.1. Síntese dos compostos voláteis	16
2.2.3. Processo de extração do Azeite	19
2.2.4. Classificação do azeite.....	21
2.3. Modos de Produção	23
2.3.1. Modo de Produção Biológico	23
2.3.1.1. Contextualização do Modo de Produção Biológico (Europa e Portugal) ..	23

2.3.1.2. Fertilização.....	25
2.3.1.2.1. Fertilização orgânica.....	25
2.3.1.2.2. Fertilização mineral	27
2.3.1.3. Gestão de Pragas e Infestantes em Agricultura Biológica.....	27
2.3.1.4. Poda.....	29
2.3.1.5. Colheita.....	30
2.3.2. Modo de Produção Integrada	31
2.3.2.1. Fertilização.....	32
2.3.2.2. Proteção Fitossanitária	32
2.3.3. Modos de Produção e correlação com os Compostos Voláteis em azeite	32
2.4. Cromatografia gasosa.....	34
2.4.1. Equipamento de cromatografia gasosa.....	36
2.4.1.1. Colunas	37
2.5. Espectrometria de Massa	38
2.6. Desconvolução em GC-ToF-MS	39
3. Materiais e Métodos	41
3.2. Métodos.....	43
3.2.1. Parâmetros Químicos da Qualidade.....	43
3.2.1.1. Acidez	43
3.2.1.2. Índice de Peróxidos	44
3.2.1.3. Índices Espectrofotométricos.....	45
3.2.2. Compostos Voláteis.....	47
3.2.2.1. Técnica de preparação de amostra	47
3.2.2.2. Análise por cromatografia gasosa – espectrometria de massa.....	48
3.2.3. Análise Estatística	48
4. Resultados e Discussão	50
4.1. Parâmetros químicos da qualidade	51
4.1.1. Acidez	51

4.1.2. Índice de Peróxidos	52
4.1.3. Índices Espectrofotométricos	53
4.2. Composição volátil dos azeites	55
4.2.1. Qualidade do azeite e relação com os compostos voláteis	61
4.3. Análise da fracção volátil	64
4.3.1. Aldeídos	66
4.3.2. Álcoois	68
4.3.3. Hidrocarbonetos acíclicos e cíclicos	69
4.3.4. Ésteres	71
4.3.5. Cetonas	72
4.4. Análise estatística	72
5. Conclusão	84
6. Referências Bibliográficas	88

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Ácidos gordos maioritários presentes no azeite.	12
Tabela 2.2 - Valores máximos estipulados para o teor de ceras em azeite.	14
Tabela 2.3 - Valores regulamentados para a classificação do Azeite.....	22
Tabela 4.1 - Teores de acidez para os azeites em estudo, de diferentes variedades e modo de produção.	51
Tabela 4.2 - Valores de índice de peróxidos para aos azeites em estudo.	52
Tabela 4.3 - Valores de K232, K268 e ΔK nos azeites de modo de produção biológico e produção integrada.	53
Tabela 4.4 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos aldeídos.	56
Tabela 4.5 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos álcoois.....	57
Tabela 4.6 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos acíclicos.	58
Tabela 4.7 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos cíclicos.	59
Tabela 4.8 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos ésteres.	59
Tabela 4.9 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química das cetonas.	60
Tabela 4.10 - Outros compostos voláteis identificados.	60
Tabela 4.11 - Compostos voláteis "marcadores" de oxidação.....	62
Tabela 4.12 - Percentagem de área relativa das diferentes classes químicas de compostos identificados.....	64
Tabela 4.13 - Resultado da análise de variâncias (ANOVA), com teste de comparação de médias ($\alpha=0,05$), tendo como variável independente o modo de produção 1-Biológico, 2-Integrado.....	74

Índice de Figuras

Figura 2.1 - O panorama mundial da produção de azeite para a colheita de 2019/2020.	5
Figura 2.2 - Produção de azeite para países membros e não-membros do COI.....	6
Figura 2.3 - Evolução da produção de azeite em Portugal nas últimas dez campanhas.	7
Figura 2.4 - Consumo de azeite por habitante em membros do COI e pertencentes à UE.	9
Figura 2.5 - Formação dos compostos voláteis com as respetivas enzimas envolvidas no processo.	17
Figura 2.6 - Processo genérico de obtenção do azeite.	21
Figura 2.7 - Evolução da área agrícola em modo de produção biológico. De 1994 a 2011, dados referentes a Portugal Continental; de 2012 a 2020, dados referentes a Portugal Continental e Arquipélagos dos Açores e Madeira.	24
Figura 2.8 - Método de separação por cromatografia gasosa.	35
Figura 2.9 - Representação esquemática de um cromatógrafo gasosos acoplado à espectrometria de massa.....	37
Figura 2.10 - Representação de um espectro de massa.	39
Figura 3.1 - Fluxograma do procedimento para a determinação da acidez no azeite.....	43
Figura 3.2 - Fluxograma do procedimento para a determinação do índice de peróxidos no azeite.	45
Figura 3.3 - Fluxograma do procedimento para a determinação dos índices espectrofotométricos no azeite.....	46
Figura 4.1 - Cromatograma da amostra de azeite da variedade Galega obtido por HS-SPME – GC- TOF/MS.	56
Figura 4.2 - Cromatograma da amostra de azeite de Galega (C) obtido por HS-SPME – GCToF/MS, referente à co-éluição do composto acetato de 3-Hexen-1-ol (isómero) com o 2-Penten-1-ol (isómero).....	63
Figura 4.3 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos aldeídos.	66
Figura 4.4 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos aldeídos, excluindo o isómero do 2-Hexenal com maior intensidade.....	67
Figura 4.5 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos álcoois.	68

Figura 4.6 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos acíclicos.	69
Figura 4.7 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos cíclicos.	70
Figura 4.8 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos ésteres.	71
Figura 4.9 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química das cetonas.	72

Lista de Abreviaturas

- Genéricas

AVC – Acidente Vascular Cerebral

A_{λ} – Absorvância

c – Concentração

DAC – Doença Arterial Coronariana

ENAB – Estratégia Nacional para a Agricultura Biológica

GC – Cromatografia Gasosa

GC-TOF- MS - Cromatografia gasosa- *time of flight*- espectrometria de massa

HPL – Hidroperóxido liase

HS - SPME - microextração em fase sólida com extração no espaço de cabeça

IP - índice de peróxido

I - Percurso ótico

LOX – Via da lipoxigenase

LRI – Índice de Retenção Linear ou índices de Kovats

M – Molaridade

M.O – Matéria Orgânica

MPB – Modo de Produção Biológico

MPI – Modo de Produção Integrado

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated fatty acids*)

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ppm – partes por milhão

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acids*)

rpm – rotações por minuto

s.d. – sem data

T – Temperatura

t_r – tempo de retenção

- Entidades

COI – Conselho Internacional Oleícola

DGADR – Direção-Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural

EDIA – Empresa de Desenvolvimento e Infra-estruturas do Alqueva

INE – Instituto Nacional de Estatística

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

UE – União Europeia

- Lista de Símbolos

λ - Comprimento de onda (nm)

°C – Graus Celsius

C₅ – Composto com cinco átomos de carbono

C₆ – Composto com seis átomos de carbono

K_λ - índice espectrofotométrico a um dado comprimento de onda

°Ac - Grau de acidez

1. Introdução

A temática da sustentabilidade é um tópico muito atual e de grande relevância. O conceito de sustentabilidade está relacionado com a capacidade de as gerações atuais satisfazerem as suas necessidades, sem comprometer os recursos naturais e as gerações futuras (BCSD, 2021).

Um dos pilares da sustentabilidade, é a sustentabilidade ambiental. A agricultura é um dos fatores com maior impacto nesta questão, tendo em conta que muitas das práticas agrícolas que ainda são executadas, contribuem para a poluição e degradação dos recursos naturais. Assim sendo, procura-se que exista uma transição daquela que é denominada agricultura convencional/tradicional, para uma agricultura mais sustentável. A evolução nos modos de produção, tende quase sempre a ser do convencional, para a produção integrada e por fim, para o biológico. Em geral, o modo de produção biológico, apoia-se sobretudo em práticas agrícolas que fomentem a biodiversidade e que assegurem o equilíbrio dos vários sistemas que compõem a paisagem (Agrobio, s.d.).

O olival é uma das culturas que tem vindo a ser introduzida no modo de produção biológico, em regra, com produções por hectare menores, mas que tem vindo a beneficiar do facto de o produto final ser comercializado a um preço mais elevado.

No panorama da sustentabilidade, os consumidores são uma parte fundamental. Existe uma crescente consciencialização ambiental por parte dos consumidores, aliada à preocupação e interesse que demonstram em perceber o processo que envolve a produção do que consomem, procurando cada vez mais alimentos saudáveis e cuja produção tenha um impacto ambiental baixo.

O azeite é um dos principais ingredientes da dieta mediterrânica, classificada como Património Mundial e Imaterial da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) (APN, 2014). É um dos produtos mais consumido pelos países que compõe o mediterrânico, e é a gordura de eleição na Dieta Mediterrânica. De acordo com o COI (Conselho Oleícola Internacional), Portugal é o terceiro país com maior consumo de azeite. O azeite, principalmente o azeite virgem extra, está associado a muitos benefícios para a saúde, nomeadamente, menor risco de ocorrência de doenças, como cancro e diabetes e problemas cardíacos e por isso encontra-se associada a uma maior esperança média de vida (Neves & Pires, 2018).

A influência dos modos de produção e práticas agrícolas nos aspetos nutritivos dos produtos obtidos tem vindo a ser investigada (Carrapiso et al., 2020; Gutiérrez et al., 1999; Ninfali et al., 2007).

Nesse sentido, pretendeu-se explorar neste trabalho, uma estratégia que permitisse a diferenciação de azeites obtidos em modo de produção integrada (MPI) e biológico (MPB), com vista à sua valorização, utilizando técnicas avançadas de cromatografia gasosa acopladas a espectrometria de massa (GC-ToF-MS), que permitem uma análise de matrizes mais complexas, como é o caso do azeite.

Os compostos minoritários do azeite são importantes na medida em que permitem diferenciar quimicamente os azeites. Os compostos voláteis contribuem para a diferenciação dos azeites e são os principais responsáveis por atributos negativos e positivos no azeite (Silva et al., 2011). Os compostos voláteis presentes no azeite variam em função de vários fatores, como variedade, clima, região (solo), técnicas de colheita e armazenamento e o processamento (Silva et al., 2011).

Existem poucos estudos que relacionem os modos de produção e o seu possível efeito no perfil volátil dos azeites. Assim, este trabalho focou-se em explorar a composição volátil de azeites de diferentes variedades e modos de produção e estudar a sua utilidade para a diferenciação dos azeites.

Com esta finalidade, foi analisada a composição volátil de azeites virgem extra monovarietais de Galega, Cobrançosa e Arbequina obtidos nos dois modos de produção, e caracterizados do ponto de vista dos parâmetros químicos da qualidade, nomeadamente, acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos.

2. Revisão da Literatura

2.1. O Setor oleícola

2.1.1. Panorama Mundial

A produção mundial de azeite atingiu os 3,2 milhões de toneladas na campanha de 2019/2020, tendo-se verificado que a produção triplicou nos últimos 60 anos (Agroportal, 2021). Na Figura 2.1, encontra-se representada a produção mundial de azeite para a campanha de 2019/2020.

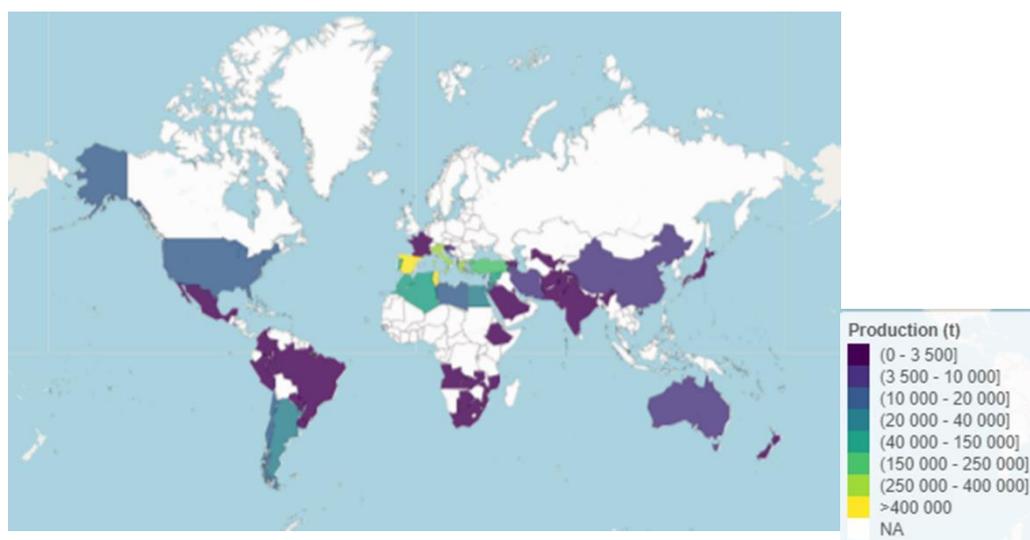


Figura 2.1 - O panorama mundial da produção de azeite para a colheita de 2019/2020.

(Fonte: COI, 2022.)

De acordo com dados do *International Olive Council* (COI), os países que são membros desta organização, da qual Portugal faz parte, são neste momento responsáveis por cerca de 93% da produção de azeite mundial. Mais especificamente, os países que integram a União Europeia (UE) produzem mais de 68% do azeite que é consumido no mundo. Dentro da UE, os maiores produtores concentram-se na zona do mediterrâneo, região em que existe a tradição da oliveira e da azeitona. Neste momento, os países que mais se destacam em termos de produção de azeite são a Espanha, Itália, Grécia e Portugal.

Na Figura 2.2 estão representados os valores de produção de azeite da campanha de 2020/2021 dos países que atualmente mais se destacam na produção de azeite, que inclui países-membros da UE e novos produtores.

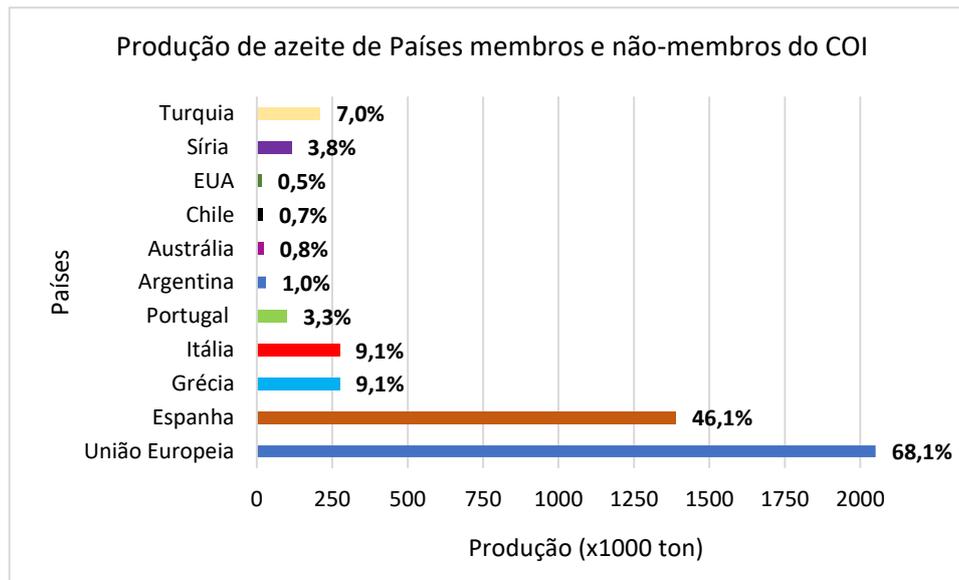


Figura 2.2 - Produção de azeite para países membros e não-membros do COI.

(Fonte: Adaptado do COI, 2022.)

Nos países da UE, a produção de azeite constitui um sector de grande relevância socio-económica. Atualmente, tem vindo a assistir-se à entrada neste mercado de países que não eram produtores de azeitona, nomeadamente países como a Argentina, Austrália, México, Chile e EUA. Embora os valores de produção destes países ainda não sejam elevados, começam a ganhar alguma relevância num setor tão competitivo como o sector oleícola (Espadas-Aldana et al., 2019).

Estes novos países produtores destacam-se pela utilização de técnicas intensivas com elevada mecanização que lhes permite, por um lado, reduzir os custos de produção, mas que suscitam outras questões, relacionadas com a sustentabilidade, o que pode constituir uma oportunidade para a UE relativamente a produções com uma vertente orgânica (Espadas-Aldana et al., 2019).

Observando os dados das produções mundiais, nota-se que estas têm sofrido um aumento ao longo dos anos, mas que existem ainda algumas flutuações nesses crescimentos, influenciadas por diversos fatores, entre os quais, a incerteza climática.

De facto, para a campanha de 2021/2022 estimasse que a produção mundial de azeite atinja as 3.098.500 toneladas, o que se traduz num aumento de 2,9% face à campanha de 2020/2021. No entanto, ao contrário do que seria expectável, dos países produtores pertencentes à UE, é apontada uma descida no volume de produção de cerca de 3,8% (COI, 2022).

Sendo um gigante na produção, a UE é também responsável pelo grosso das exportações. Grande parte desta exportação tem como destino os EUA, um grande consumidor de azeite. A Espanha é dos maiores exportadores de azeite, seguido da Itália, Portugal e Grécia (Eurostat, 2019).

Como referido anteriormente, a produção de azeite é de grande importância económica para os países do mediterrâneo, mas esta atividade está associada a aspetos negativos que começam a levantar algumas questões, relativamente à gestão de resíduos e à forma como os recursos são alocados.

2.1.2. Produção em Portugal

Em Portugal, a área total de olival registada em 2020 era de 379.444 ha, em que 199.803 ha correspondiam à área de olival no Alentejo, portanto a região do Alentejo alberga cerca de 53% da área total de olival (EDIA, 2022).

Desde 2014 que Portugal consegue assegurar uma produção de azeite suficiente para ser considerado como autossuficiente. O Alentejo é a região em que o olival assume uma maior incidência, verificando-se quer uma implementação de novos olivais quer uma reestruturação dos olivais existentes (Portal da Agricultura, 2021).

As outras regiões do país em que o olival também está presente e em que a sua área é significativa são, a região do Douro e Trás-os-Montes e na região centro, onde a área de olival é cerca de 18% do total da área a nível nacional (Portal da Agricultura, 2021).

A produção de azeite em Portugal nas últimas 10 campanhas encontra-se ilustrada na Figura 2.3.

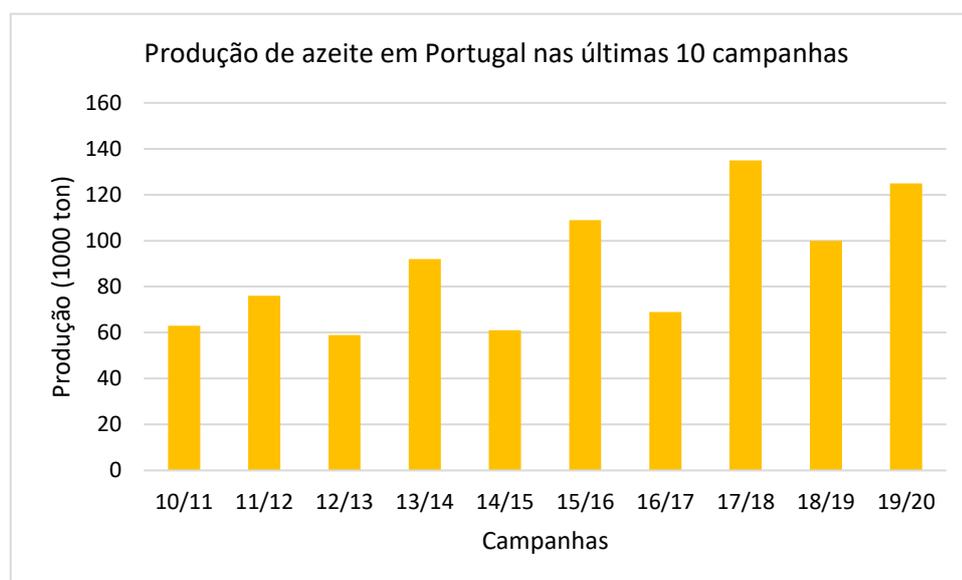


Figura 2.3 - Evolução da produção de azeite em Portugal nas últimas dez campanhas.

(Fonte: Adaptado da Casa do Azeite, 2021).

Apesar de se verificar um aumento da produção aos longo dos anos, também é notório que o crescimento não é estável e estas oscilações na produção estão relacionadas com a instabilidade das condições edafoclimáticas a que Portugal e tantos outros países estão sujeitos. Além destas instabilidades, aspetos técnicos como podas, fertilizações também influenciam a produção.

Em Portugal, e de acordo com as estatísticas agrícolas de 2021, a produção de azeite disparou para um máximo histórico de 2,29 milhões de hectolitros (mais 49% que em 2019, o segundo melhor registo desde 1915) em resultado de condições meteorológicas favoráveis, conjugadas com o aumento da importância dos olivais intensivos de regadio e com o facto de ter sido um ano de safra (INE, 2021).

Em Portugal, estima-se que seja atingido um novo recorde de produção, cerca de 150 mil toneladas de azeite, sendo o Alentejo a região que contribui em peso para estes valores de produção, podendo nesta região atingirem-se valores de 20 toneladas de azeite por hectare (Agroportal, 2021).

2.1.3. Consumo de azeite

Os países mediterrânicos, além de grandes produtores também se assumem como ávidos consumidores de azeite. Cerca de 43% do consumo de azeite provém dos países que integram a UE e que foram mencionados anteriormente.

O consumo de azeite está conectado à dieta mediterrânica que é praticada nestes países. Esta dieta não se assume tanto como uma dieta, mas é referida como um estilo de vida, pois engloba muitos outros aspetos que acabam por passar despercebidos. A dieta mediterrânica é descrita como "um estilo de vida, que envolve todo um conjunto de conhecimento, técnicas, rituais, símbolos e tradições e que respeita todo o processo que resulta num prato de comida, desde a produção até à confeção dos alimentos e que respeita a partilha que acontece na hora da refeição." (Neves & Pires, 2018). Vários países da zona do mediterrâneo criaram uma petição para o reconhecimento desta dieta como Património Mundial da Unesco. Atualmente, são associados à dieta mediterrânica muitos benefícios para a saúde. A esta dieta está associada a uma esperança média de vida superior e um menor risco de ocorrência de doenças, como cancro, diabetes e sobretudo problemas cardíacos (Neves & Pires, 2018).

O azeite virgem extra apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes que podem ajudar a melhorar a massa muscular e a saúde em geral (Salucci et al., 2022).

Estas propriedades advêm da composição química dos azeites, nomeadamente da presença de tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos. Salucci et al. (2022) referem, em concreto, que os compostos fenólicos aparentam ser responsáveis pela maioria das propriedades benéficas do azeite virgem extra, por atuarem no controlo de espécies reativas de oxigénio.

Segundo dados de 2019/2020 do COI, o consumo de azeite é elevado em países pertencentes à União Europeia, e nos países da zona do mediterrâneo (Espanha, Grécia, Portugal, Itália, com o Chipre muito perto), como ilustrado na Figura 2.4.

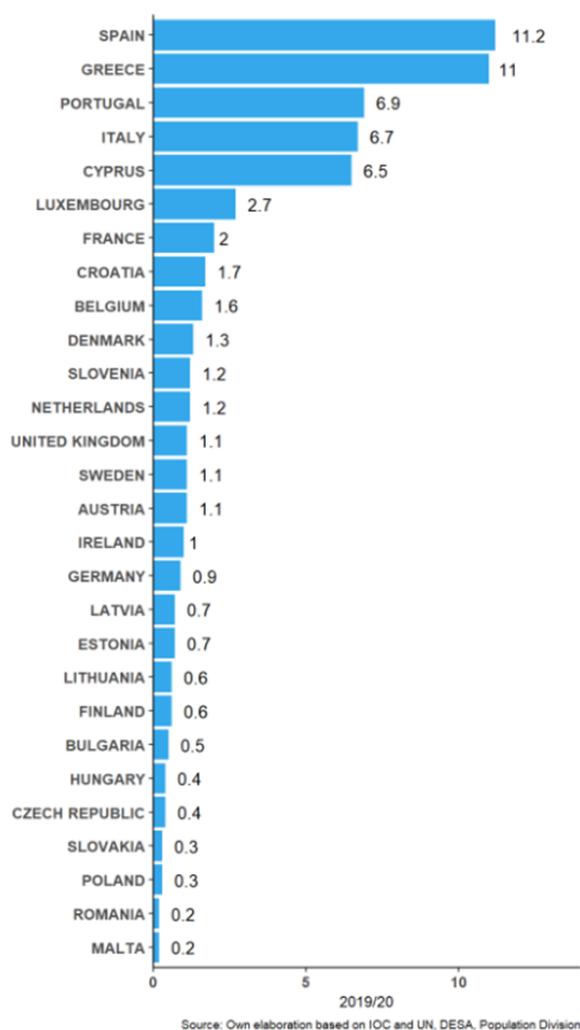


Figura 2.4 - Consumo de azeite (kg/habitante) por habitante em membros do COI e pertencentes à UE.

(Fonte: COI, 2022)

Em média o consumo em Portugal, ronda os 6,9 kg de azeite por habitante, sendo Espanha o país com o consumo mais elevado (11,2 kg/habitante) (COI, 2022).

Em Portugal, o sector oleícola tem um papel muito relevante na economia, estimando-se que a produção tenha atingido as 149,9 mil toneladas na campanha de 2019/2020. A maior parte da área ocupada por olival destina-se à produção de azeite (374.762 ha) (INE, 2020).

2.2. O Azeite

2.2.1. Um pouco sobre a história da oliveira e do azeite

A oliveira (*Olea europaea* L.) é retratada na literatura como simbolismo de amizade e paz.

São conhecidas mais de 30 espécies de oliveira, mas é referido na literatura que a árvore que hoje conhecemos aparenta ter tido a sua origem há mais de 5.000 anos, na região da antiga Pérsia e Mesopotâmia (Kapellakis et al., 2008).

Os Fenícios foram responsáveis pela expansão da cultura para o ocidente como consequência de trocas marítimas. Por volta de 1000 a.C. a oliveira chegou à região da Grécia e como resultado do estabelecimento de colónias deste país em outras regiões da bacia do mediterrâneo, a cultura foi introduzida em países como Espanha.

O uso do azeite sempre foi muito amplo e a utilização que lhe era dada desde o tempo dos romanos, persiste até aos dias de hoje. Era utilizado na culinária, medicina, em produtos de cosmética como perfumes, sabonetes, cremes, em cerimónias religiosas e provavelmente o mais conhecido, nos candeeiros de óleo (Sahin & Aydin, 2017).

O consumo de azeite é característico dos povos da região do mediterrâneo devido ao seu papel na cultura. No entanto, atualmente, a sua utilização já se expandiu a outras zonas do mundo, devido em grande parte às propriedades benéficas que o seu consumo representa para a saúde dos consumidores. O seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados, propriedades antibacterianas e efeito antiinflamatório devido à presença de antioxidantes contribuem positivamente para a saúde cardiovascular, na medida em que atuam na pressão arterial (Foscolou et al., 2018).

De acordo com Foscolou et al. (2018), o consumo de azeite reduz a ocorrência de eventos como acidentes vasculares cerebrais (AVC) e doença arterial coronariana (DAC), respetivamente em 4% e 26%. Além disso, está também associado a um risco menor de ocorrência de diferentes tipos de cancro e de diabetes do tipo II.

2.2.2. Composição química do azeite

A composição química dos azeites é influenciada por inúmeros fatores, dos quais se salientam os genéticos relacionados com a variedade, os ambientais (solo e clima), os agronômicos (rega e fertilização), os da produção (colheita e maturação) e ainda fatores relacionados com a pós-colheita e sistemas de extração (Aparício & Guadalupe, 2002).

Na composição química do azeite é feita a distinção entre fracção saponificável, que constitui cerca de 97% a 99% do peso total do azeite, e a fracção minoritária, denominada de insaponificável (Ferreira, 2012). A fracção saponificável engloba diversas classes de compostos, tais como: triacilgliceróis, fosfolípidos e ácidos gordos livres.

A fracção insaponificável é constituída por compostos de diversas classes químicas como: ceras, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, pigmentos, compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis, compostos voláteis e aromáticos (Ferreira, 2012).

Os compostos que constituem a fracção minoritária não são de menor importância. Aliás, estas substâncias são determinantes no que se relaciona com a estabilidade e a qualidade organolética do azeite, aspecto preponderante na classificação do azeite.

2.2.2.1. Fracção Saponificável

Como referido anteriormente, integram a fracção saponificável, os ácidos gordos livres, os triacilgliceróis e os fosfolípidos.

A quantificação dos ácidos gordos livres é um importante indicador da qualidade dos azeites e é imprescindível para a classificação comercial deste produto. Para a classificação comercial dos azeites é também importante a identificação e a quantificação dos ácidos gordos livres especialmente os que apresentam isomeria *trans*, que devido a imposições legais se encontra estabelecida a quantidade máxima permitida nas diferentes categorias comerciais dos azeites (Teixeira, 2015).

Em termos químicos, os ácidos gordos possuem uma cadeia hidrocarbonada que apresenta numa das suas extremidades, um grupo carboxílico.

Os ácidos gordos podem ser classificados em saturados ou insaturados, consoante apresentem na sua estrutura química, ligações simples ou duplas, respetivamente, entre os átomos de carbono que constituem a cadeia hidrocarbonada (Ferreira, 2012). Assim, as diferentes classes de ácidos gordos são:

- os ácidos gordos saturados, que possuem meramente ligações simples na cadeia hidrocarbonada;
- os ácidos gordos monoinsaturados, também denominados MUFA (do inglês “monounsaturated fatty acids”) que apresentam apenas uma ligação dupla na cadeia hidrocarbonada;
- os ácidos gordos polinsaturados ou PUFA (do inglês “polyunsaturated fatty acids”) que têm duas ou mais ligações duplas na cadeia hidrocarbonada.

Na Tabela 2.1 são apresentados os ácidos gordos maioritários presentes no azeite em maior quantidade e os seus limites em percentagem para o azeite virgem extra:

Tabela 2.1 - Ácidos gordos maioritários presentes no azeite.

Ácido gordo	Nomenclatura	Limites (%) ¹
Ácido oléico	C _{18:1}	55,00 – 85,00
Ácido palmítico	C _{16:0}	7,00 – 20,00
Ácido linoleico	C _{18:2}	2,50 – 21,00
Ácido esteárico	C _{18:0}	0,50 – 5,00
Ácido palmitoleico	C _{16:1}	0,30 – 3,50

(Fonte: Adaptado de Ferreira, 2012)

2.2.2.1.1. Triacilgliceróis

Do ponto de vista químico, o triacilglicerol resulta da esterificação da molécula de glicerol com os ácidos gordos livres (Teixeira, 2015).

Os triacilgliceróis presentes no azeite em maior quantidade são 1,2,3-trioleoilglicerol-OOO (40-59%), rac-1,2-dioleoil-3-palmitoilglicerol-OOP (12-20%), rac-1,2-dilinoil-3-oleoilglicerol-LLO (12,5-20%), 1-palmitoil-2-oleoil-3-linoilglicerol-POL (5,5-7%), rac-1,2-dioleoil-3-estearoilglicerol-OOS (3 - 7%) (Ferreira, 2012). A sua presença e teores constituem um critério de qualidade para os

¹ Regulamento delegado (EU) 2022/2104 da comissão de 29 de julho de 2022 que complementa o Regulamento (EU) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante às normas de comercialização do azeite e que revoga o Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão e o Regulamento de Execução (EU) nº 29/2012 da Comissão

azeites, uma vez que o processo de hidrólise destes compostos, influencia a acidez (Conceição, 2020).

É de referir que os triacilgliceróis são classificados de acordo com o número de ácidos gordos esterificados que entram na sua composição. No azeite, além dos triacilgliceróis, encontram-se também mono e diacilgliceróis, correspondente à presença de um ou dois ácidos gordos esterificados, encontrando-se estas duas classes de compostos em teores significativamente mais baixos, comparativamente com os triacilgliceróis (Ferreira, 2012).

2.2.2.1.2. Fosfolípidos

Quimicamente, os fosfolípidos são compostos por um grupo fosfato, glicerol e duas caudas apolares que são duas moléculas de ácidos gordos (Ferreira, 2012). Igualmente, para esta classe de compostos, o tipo de fosfolípido e as concentrações máximas encontram-se legisladas, por categoria comercial de azeite.

2.2.2.2. Fracção Insaponificável

Apesar desta ser uma fracção minoritária, os compostos que constituem esta fracção são muito específicos para cada azeite.

Em particular, em diversos estudos tem sido reportado que alguns dos compostos que constituem a fracção insaponificável e a sua concentração, permitem a diferenciação de azeites, de acordo com a sua variedade. Assim, em azeites provenientes de mistura de várias variedades (*blends*), a análise dos compostos minoritários pode permitir inferir quais as variedades de azeitona presentes no azeite.

Nesta fracção encontram-se os seguintes compostos: ceras, derivados de esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis, pigmentos, tocoferóis, compostos fenólicos e os álcoois alifáticos (Ferreira, 2012).

2.2.2.2.1. Ceras

As ceras resultam da esterificação de um ácido gordo com um álcool. As ceras encontram-se na epiderme dos frutos e a sua função passa por impermeabilizar o fruto, impedindo que ocorra perda de água.

Quando os azeites apresentam um elevado grau de acidez, a quantidade de ceras é mais elevada devido à esterificação dos álcoois alifáticos com ácidos gordos livres (Arruda, 2018). No entanto, segundo Boskou (2011), o teor de ceras no azeite é muito baixo e não excede os 35 mg/100g de azeite.

As ceras mais comuns no azeite são o C₃₆-C₄₆, ésteres de ácido oleico ou de palmítico.

A turvação do azeite pode ser causada pelas ceras, que cristalizam quando o azeite é arrefecido.

Andrade et al. (2013), refere que a análise do teor de ceras presente no azeite passou a ser obrigatório em 2002, para a rotulagem dos azeites virgem extra. O limite máximo imposto, segundo o Regulamento (UE) N^o 1019 de 13 junho é de 250 mg/kg de azeite. No entanto, de acordo com dados do International Olive Council (COI), publicados em junho de 2022, os limites máximos variam consoante a categoria do azeite, descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Valores máximos estipulados para o teor de ceras em azeite.

Categoria	Teor de ceras (mg/kg)
Azeite virgem extra	≤ 150
Azeite virgem	≤ 150
Azeite lampante	≤ 300
Azeite refinado	≤ 350
Azeite composto por azeite refinado e azeite virgem	≤ 350
Óleo de bagaço de azeitona bruto	> 350
Óleo de bagaço de azeitona refinado	> 350
Óleo de bagaço de azeitona	> 350

(Fonte: Adaptado de COI, 2022)

2.2.2.2.2. Álcoois alifáticos

A concentração destes compostos no azeite difere consoante a variedade e a região onde ocorre a produção, o que permite de certo modo diferenciar os azeites (Carapinha, 2012).

Os principais álcoois alifáticos que se pode encontrar no azeite são o docosanol, tetracosanol, hexacosanol, octacosanol, tricosanol, pentacosanol e o heptacosanol (Ferreira, 2012).

2.2.2.2.3. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos presentes no azeite em quantidade significativa são o esqualeno e β-caroteno. O esqualeno constitui mais de metade da fracção insaponificável do azeite e está

associado aos efeitos benéficos para a saúde dos consumidores devido ao facto de constituir um precursor metabólico do azeite (Boskou, 2011).

2.2.2.2.4. Polifenóis

Estes compostos tem um forte impacto nas características organolépticas dos azeites, em especial dos azeites virgem extra, assim como na sua estabilidade oxidativa. A presença dos polifenóis é influenciada por fatores genéticos e agronómicos (Boskou, 2011).

A estrutura básica deste tipo de compostos é uma estrutura aromática cuja unidade básica é o fenol. Nos compostos fenólicos estão incluídos os ácidos e álcoois fenólicos, secoiridoídes e derivados, lignanos e flavonóides (Ferreira, 2012).

O teor de polifenóis nos azeites pode variar entre 100 e 300 mg/kg e é importante para a estabilidade e propriedades sensoriais do azeite. Boskou (2011) refere que quando o teor de polifenóis no azeite excede os 300 mg/kg, estes podem apresentar notas de amargo. Fundamentalmente, o amargo é devido à presença de uma elevada quantidade de oleuropeína no azeite - um composto fenólico, que confere aos azeites, esta característica. Se por um lado, quando o teor de polifenóis excede o limite referido tem impacto negativo na qualidade organoléptica do azeite, tem um efeito positivo na estabilidade do azeite pois existe uma correlação entre a estabilidade do azeite e o conteúdo em fenóis (Boskou, 2011). Os polifenóis são compostos com propriedades antioxidantes que atenuam a formação de radicais livres, responsáveis pela oxidação e degradação do azeite.

2.2.2.3. Compostos voláteis

Os compostos minoritários do azeite são importantes na medida em que permitem diferenciar quimicamente os azeites. Destes, os que permitem uma diferenciação mais notória são os compostos voláteis.

Como refere da Silva et al. (2011) “os compostos voláteis são considerados como os principais responsáveis por atributos negativos e positivos no azeite”.

Os compostos voláteis presentes no azeite variam em função de vários fatores. Cada variedade de azeitona pode ser diferenciada pelo seu perfil volátil. Contudo, existem outros fatores como o clima, a região de produção (solo e clima), técnicas de colheita e armazenamento e ainda fatores relacionados com as técnicas de produção, tais como a rega e a fertilização, que também apresentam uma influência significativa nos perfis voláteis dos azeites (Silva et al., 2011).

2.2.2.3.1. Síntese dos compostos voláteis

Os compostos voláteis têm como principal origem uma cadeia de reações enzimáticas, denominada via da lipoxigenase (LOX). Os compostos sintetizados pela LOX - nomeadamente aldeídos, álcoois e ésteres, são produzidos maioritariamente na etapa de moenda da azeitona, quando a rutura da película permite o contacto das enzimas com a polpa das azeitonas. Contudo, o perfil em compostos voláteis pode ser influenciado ao longo de todo o processo até à obtenção do azeite e consequente armazenamento, tanto por fatores agronómicos, como pelas condições de extração e armazenamento do azeite. Os compostos voláteis são os responsáveis pelos aromas dos azeites. Os compostos com origem na LOX estão associados a aromas agradáveis, enquanto compostos com origem nas vias secundárias, como atividade enzimática de fungos, fermentações e processos oxidativos, estão associados a defeitos sensoriais (Kalua et al., 2007).

Assim, a síntese dos compostos voláteis ocorre muito precocemente, ainda durante a etapa de amadurecimento do fruto devido, em parte, à produção e libertação de etileno que tem efeito na atividade de certas proteínas e enzimas nos frutos. É também nesta etapa que as azeitonas são colhidas, obviamente num estado de maturação adequado e, posteriormente, é extraído o azeite. Mais acresce, que a “maioria dos compostos voláteis são também formados por acção de enzimas, quando a azeitona é prensada e durante a termobatedura” (Custódio, 2009).

As vias da lipoxigenase são determinantes na síntese de compostos C₆ na fracção volátil do azeite. Os aldeídos (C₆), álcoois e ésteres são os compostos responsáveis pelo aroma do azeite virgem extra e por conseguinte, pela qualidade organolética do mesmo (Sánchez-Ortiz *et al.* 2012).

Estes compostos voláteis são os mais significativos, tanto em quantidade como em contributo para o aroma dos azeites. De acordo com Aparicio & Harwood (2013), estes compostos constituem cerca de 60 a 80% da totalidade da fracção volátil do azeite.

A via da lipoxigenase é desencadeada durante o processo de extração do azeite, nomeadamente quando as azeitonas são prensadas e durante a termobatedura/ malaxação. Durante estas etapas, a atividade enzimática é promovida e é determinante para o aroma final do azeite. A atividade relativa das enzimas envolvidas na via da lipoxigenase é determinante para o aroma final do azeite e está interligada com fatores como a variedade, grau de maturação das azeitonas e das condições durante o processo de extração do azeite (Aparicio & Harwood, 2013).

A via da lipoxigenase são essencialmente reações de oxidação em cadeia de onde derivam os compostos mencionados anteriormente. Esta via de síntese de compostos voláteis tem vários ramos, sendo um deles a oxigenação de ácidos gordos polinsaturados não esterificados que contém

uma estrutura Z,Z-1,4-pentadieno, como o ácido linoleico e linolénico (Aparicio & Harwood, 2013; Custódio, 2009).

Tal como ilustrado na Figura 2.5, os ácidos gordos polinsaturados são oxidados e as suas ligações duplas são quebradas, por intermédio das enzimas lipoxigenase e hidroperóxidoliase em aldeídos que, posteriormente, são reduzidos a álcoois pela enzima álcool desidrogenase e em seguida, estes são reduzidos a ésteres pela enzima álcool acetil transferase (Ferreira, 2012).

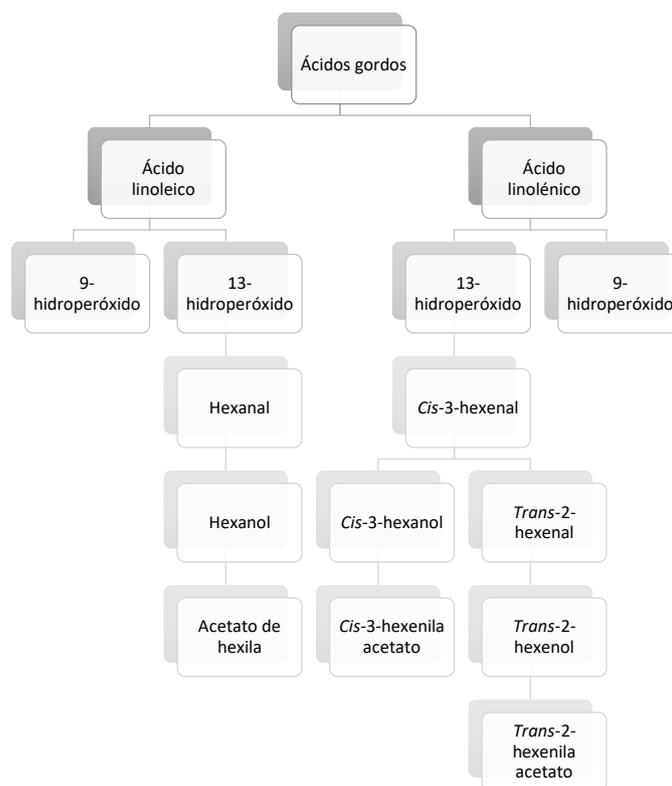


Figura 2.5 - Formação dos compostos voláteis com as respetivas enzimas envolvidas no processo.

(Fonte: Kalua et al, 2007, adaptado de Custódio, 2009)

Estes ácidos gordos sofrem uma quebra enzimática em aldeídos C₆ e C₉ e em oxoácidos C₉ e C₁₂, cuja presença influencia fortemente o aroma dos azeites. Os compostos C₆, nomeadamente, aldeídos e álcoois, são os compostos mais abundantes que estão associados positivamente ao aroma, contribuindo para azeites com notas verdes e frutadas (Custódio, 2009).

A enzima hidroperóxido liase (HPL) é responsável pela quebra dos hidroperóxidos de onde resultam os compostos mencionados acima. A quebra destes hidroperóxidos pode também ocorrer por uma outra via adicional da lipoxigenase, na ausência da HPL (Custódio, 2009). Desta reação obtém-se aldeídos C₁₃ e álcoois C₅ e respetivos ésteres. Tal como os compostos C₆, os compostos C₅ têm também um papel na componente aromática do azeite e estão associados a azeites com aromas mais doces e frutados.

Aparicio & Harwood (2013) referem que o aroma final de um azeite estará dependente da atividade e especificidade de todas as enzimas envolvidas no processo de formação dos compostos voláteis e de outros fatores como características bioquímicas e moleculares intrínsecas dos frutos, as condições em que foram produzidos, tanto edafoclimáticas como técnicas produtivas (fertilização, rega e processamento).

Na tabela seguinte estão identificados alguns compostos voláteis presentes no azeite e as respetivas notas aromáticas.

Quadro 2.1 - Compostos voláteis e aromas percecionados no azeite.

Composto volátil	Aroma
(Z)-3-hexenal	Verde, Folhas verdes
Etil 2-metilbutirato	Frutado
Etil isobutirato	Frutado
Etil ciclohexano carboxilato	Frutado
(Z)-2-Nonenal	Verde, Gorduroso
4-metoxi-2-metil-2-butanotiol	Groselha
2-metilpropil butanoato	Avinhado, Tulha
Hexanal	Verde, Maçã verde, Erva cortada, Sebo, Gorduroso
(E)-3-hexen-1-ol	Verde
(E)-2-hexen-1-ol	Erva verde, Folhas, Doce, Amêndoa amarga
Hexil acetato	Verde, Frutado, Doce
(Z)-3-hexenil acetato	Verde, Banana
2-Metilpropanoato	Frutado
2-Metilbutanoato	Frutado
Heptanal	Gorduroso, Citrinos, Rançoso
(E)-2-nonenal	Papel, Gorduroso

(E)-2-octenal	Herbáceo, Picante
(Z)-3-nonenal	Papel, Gorduroso
(E)-2-decenal	Tinta, Peixe, Sebo
Hexanal (Z)-3-hexen-1-ol	Erva verde
Nonanal	Gorduroso, Cera, Picante, Citrinos, Verde
Octanal	Gorduroso, Citrinos, Verde, Sabão
2,4-decadienal	Cozido
Álcool fenetílico/ Fenil etanol	Doce
Fenilacetaldéido	Doce
(E)-2-hexenal	Verde, Maçã, Amêndoa amarga, Verde adstringente

(Fonte: Adaptado de Silva K., 2021)

2.2.3. Processo de extração do Azeite

Na chegada ao lagar, as azeitonas devem ser selecionadas e verificado o seu estado sanitário, assim como o estado de maturação e determinado o teor em matéria gorda (Palma, 2022).

As etapas preliminares do processo de extração do azeite são a desfolha e a lavagem das azeitonas. A desfolha envolve a eliminação de folhas e ramos que possam ter permanecido, através de ventilação forçada (Palma, 2022).

A lavagem da azeitona é feita com técnicas de flutuação, que através das diferenças de densidade dos detritos permite a sua eliminação (Palma, 2022).

A etapa seguinte é a moenda ou o esmagamento das azeitonas, da qual resulta uma pasta de azeite. Esta pasta é constituída por caroços, película e polpa das azeitonas (Palma, 2022).

O tempo é um fator importante neste procedimento e pode afetar a qualidade do azeite, uma vez que o prolongamento dos tempos de moenda pode proporcionar reações de oxidação na pasta de azeite (Palma, 2022).

Palma (2022) refere que os tipos de moinho utilizados no esmagamento das azeitonas também podem influenciar a composição do azeite. Os moinhos tradicionais (de pedra) estão

associados a tempos de moagem de 15 a 20 minutos, com baixa eficiência, mas que acabam por manter o sabor característico de um azeite de confeção mais artesanal (Palma, 2022). Por outro lado, os moinhos metálicos permitem uma maior eficiência, devido a uma maior velocidade de trabalho, mas esta velocidade traduz-se num aumento de temperatura e por conseguinte propicia a formação de emulsões na pasta de azeite, o que afeta a qualidade (Palma, 2022).

Com a etapa da malaxagem, a pasta de azeite é colocada em batedeiras para que ocorra o batimento da mesma que permite a unificação das gotas de azeite, uma vez que a separação entre a água e o óleo (coalescência) é um fenómeno muito comum e que pode afetar o rendimento da extração do azeite (Palma, 2022).

Durante a malaxagem é possível que possam ocorrer reações de oxidação na pasta de azeite, que se pretende evitar para que não afete a qualidade do produto final (Palma, 2022).

A temperatura é um fator importante durante todo o processo para a obtenção do azeite e que tem particular efeito no perfil volátil e por conseguinte nas características sensoriais do azeite. Sendo os compostos voláteis de natureza gasosa, a fim de evitar que estes se evaporem rapidamente, a temperatura em que ocorre o processo de obtenção do azeite deve permanecer entre os 25 °C e 30 °C (Palma, 2022).

A fase de extração do azeite consiste na separação da fase sólida (bagaço) das fases líquidas (azeite e água). Esta etapa pode ser realizada por prensagem ou também denominado, sistema clássico de extração por centrifugação, método mais recente e mais utilizado (Palma,2022).

O sistema de extração contínuo (centrifugação) pode ser de três fases ou de duas fases.

Fala-se no sistema de extração contínuo de três fases quando no final se obtém três fases distintas: o azeite, água ruça e o bagaço. No sistema de extração de duas fases obtém-se o azeite e a fase sólida. O processo de separação no sistema de extração contínuo baseia-se na centrifugação e na diferença de densidades das substâncias a separar.

Comparativamente ao sistema tradicional de prensagem, o sistema contínuo permite uma maior eficiência, no sentido em que é necessário menos mão de obra e é possível processar uma maior quantidade de azeitona. No entanto, requer um maior investimento inicial. O sistema contínuo de duas fases apresenta mais vantagens relativamente ao de três fases, principalmente na questão da sustentabilidade. No sistema de três fases é necessária uma grande quantidade de água e por conseguinte, gera-se uma maior quantidade de água ruça, que representa um dos grandes problemas atualmente nos lagares (Palma, 2022).

Após a separação do azeite da pasta, é necessário que ocorra uma decantação para obter apenas o azeite e retirar a água. O equipamento utilizado são as centrífugas verticais, onde para que ocorra a separação das fases líquida (água e azeite) é necessário introduzir água no mosto oleoso que resultou da fase anterior do processo. A quantidade de água introduzida é um dos fatores a ter em atenção durante esta etapa, uma vez que a introdução de água em excesso pode afetar o teor de polifenóis do azeite e ter um efeito negativo no perfil sensorial do azeite (Palma, 2022).

A etapa final é o armazenamento do azeite. O objetivo é a manutenção das características químicas do azeite e por conseguinte a sua qualidade. Deste modo, o azeite é armazenado em depósitos de aço inoxidável, onde o produto fica protegido da luz e do ar e a ocorrência de reações que possam provocar a degradação da sua qualidade, é minimizada (Palma, 2022).

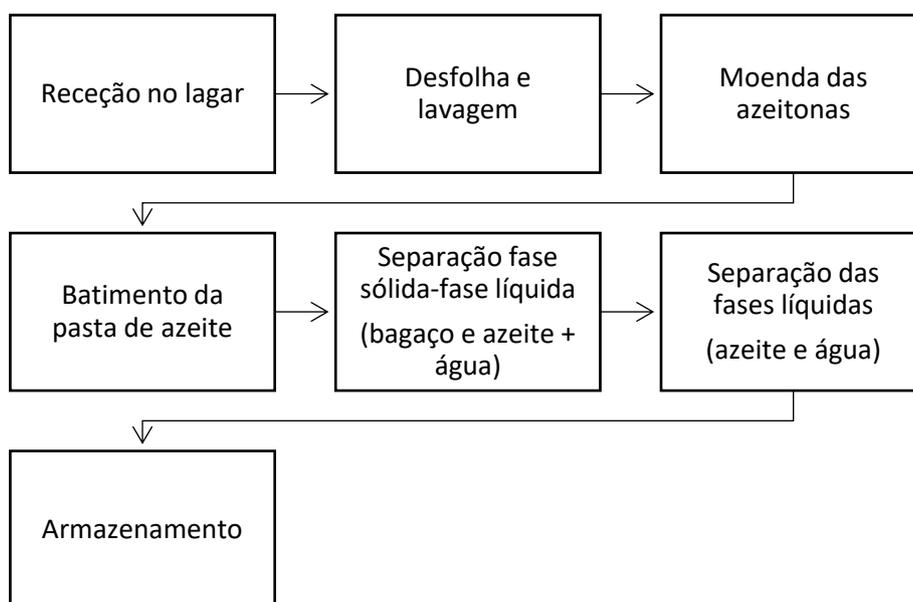


Figura 2.6 - Processo genérico de obtenção do azeite.

2.2.4. Classificação do azeite

No Regulamento (UE) 1308/2013 encontra-se a designação e descrição dos azeites e óleos de bagaço de azeitona.

O azeite está classificado por categorias: azeite virgem, azeite refinado e azeite.

A categoria de azeite virgem subdivide-se em azeite virgem extra, azeite virgem e azeite lampante. Esta classificação do azeite virgem é realizada de acordo com análises químicas e organoléticas que permitem posteriormente categorizar o azeite de acordo com a sua qualidade

(Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Valores regulamentados para a classificação do Azeite.

Categoria	Acidez (%)	Índice de peróxidos (mEq O₂/kg)	K₂₃₂²	K₂₆₈ ou K₂₇₀³	ΔK⁴
Azeite virgem extra	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
Azeite virgem	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
Azeite lampante	> 2,0	-	-	-	-
Azeite refinado	≤ 0,30	≤ 5,0	-	≤ 1,25	≤ 0,16
Azeite (refinado e virgem)	≤ 1,0	≤ 15,0	-	≤ 1,15	≤ 0,15
Óleo de bagaço de azeitona bruto	-	-	-	-	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,30	≤ 5,0	-	≤ 2,00	≤ 0,20
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,00	≤ 15,0	-	≤ 1,70	≤ 0,18

(Fonte: Regulamento (UE) 2022/2104)

O azeite lampante é um azeite de qualidade inferior que se destina apenas a refinação (azeite refinado) e não pode ser comercializado.

Na categoria de azeites não virgens pertencem o azeite refinado, azeite, óleo de bagaço de azeitona bruto e óleo de bagaço de azeitona refinado (Comissão Europeia, s.d.).

O azeite refinado é obtido por refinação de azeites virgens de qualidade inferior e não se destina ao comércio de retalho, mas sim à mistura deste com azeites virgens para obter o produto

² K₂₃₂ – coeficiente de extinção determinado no comprimento de onda de 232 nm.

³ K₂₆₈ ou K₂₇₀ – coeficiente de extinção determinado no comprimento de onda de 268 nm ou 270 nm.

⁴ ΔK - |K₂₆₈ - [(K₂₆₄ + K₂₇₂)/2]|

designado como “azeite”, e que pode ser comercializado.

Do processo de prensagem resultam resíduos como o bagaço de azeitona bruto que após refinação e mistura com azeites virgens, origina o óleo de bagaço de azeitona refinado (Azeol, 2023).

2.3. Modos de Produção

2.3.1. Modo de Produção Biológico

O modo de Produção Biológico é descrito pela Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), como:

um sistema global de gestão das explorações agrícolas e de produção de géneros alimentícios que combina as melhores práticas ambientais, um elevado nível de biodiversidade, preservação dos recursos naturais, a aplicação de normas exigentes em matéria de bem-estar dos animais e método de produção em sintonia com a preferência de certos consumidores por produtos obtidos utilizando substâncias e processos naturais. (DGADR, s.d.)

Este modo de produção visa a obtenção de produtos de elevada qualidade, que ao mesmo tempo, sejam obtidos tendo em conta práticas sustentáveis e que preservem e melhorem todo o ecossistema (Agrobio, s.d.).

A agricultura biológica funciona como um sistema preventivo, assente em técnicas que permitam a redução ou eliminação de consumíveis químicos sintéticos, como pesticidas e adubos (Saramago, 2009).

2.3.1.1. Contextualização do Modo de Produção Biológico (Europa e Portugal)

Na Europa tem-se notado um crescimento na área total em modo de produção biológico. Esta área total contempla terrenos que já são certificados e também os que ainda estão em processo de “conversão”, processo este cuja duração pode variar consoante a cultura, mas que por norma dura cerca de 2-3 anos. Em 2012 a área total em produção biológica na UE era de 9,5 milhões de hectares e em 2021 foi registada uma área total de 14,7 milhões de hectares, o que significa um aumento de 56% na área em modo de produção biológico (Eurostat, 2022).

Relativamente a Portugal, em 2012 foi registada uma área de 200.833 hectares e em 2021, 319.540 hectares, um aumento de 59,1% (Eurostat, 2022).

Assim, em 20 anos, registou-se um aumento na área agrícola em modo de produção biológico (MPB) de 84%, em Portugal Continental e ilhas (Figura 2.7).

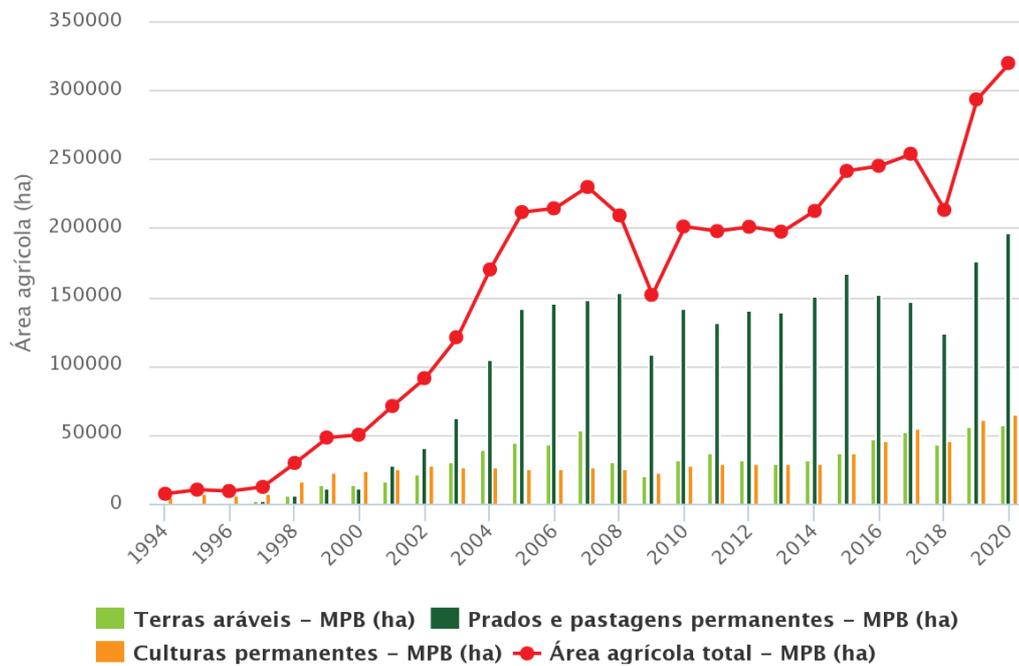


Figura 2.7 - Evolução da área agrícola em modo de produção biológica. De 1994 a 2011, dados referentes a Portugal Continental; de 2012 a 2020, dados referentes a Portugal Continental e Arquipélagos dos Açores e Madeira.

(Fonte: Portal do Estado do Ambiente, 2022)

Em 2017 foi aprovada a Estratégia Nacional para a Agricultura Biológica (ENAB) e o plano de ação para a produção e promoção de produtos agrícolas e géneros alimentícios biológicos.

A ENAB tem uma duração prevista de dez anos e contempla dez metas a atingir entre as quais (Portal do Estado do Ambiente, 2022):

- A duplicação da área de agricultura biológica para 12% da superfície agrícola utilizada (SAU) nacional até 2027;
- Incrementar o consumo de produtos biológicos em 50%;
- Triplicar a disponibilidade de produtos biológicos nacionais no mercado;
- A criação de uma rede experimental de agricultura biológica para a promoção desta a nível nacional.

O olival em modo de produção biológico coexiste com olivais em modo convencional e em modo de produção integrada, nomeadamente no Alentejo, Beira Interior e Trás-os-Montes (Saramago, 2009).

As cultivares/variedades de oliveira cultivadas diferem consoante as regiões de cultivo, uma vez que todas apresentam características diferentes e cuja adaptabilidade ao local pode condicionar o sucesso do cultivo. Em 2009, Saramago referiu que as cultivares portuguesas que

predominam nas regiões de produção de azeite biológico são Verdeal, Cobrançosa, Madural, Santulhana, Negrinha (Trás-os-Montes), Bical, Galega (Beira Interior), Galega (Alto Alentejo), Galega grada, Cordovil e Verdeal de Serpa (Baixo Alentejo).

2.3.1.2. Fertilização

Um dos pilares da agricultura, seja qual for o sistema de produção, é a fertilidade do solo e a sua gestão. No entanto, na agricultura biológica a fertilização é realizada com o objetivo de fornecer nutrientes não só às plantas mas sobretudo ao solo, de modo a manter e estimular a microbiologia do solo (Saramago, 2009).

O solo é um dos recursos naturais de maior importância e manter a sua fertilidade deve ser uma prioridade, uma vez que a produção depende em grande parte deste fator. Em Agricultura Biológica, a fertilização do solo deve fazer-se cumprir de acordo com o que consta no Regulamento (UE) 2018/848.

A gestão e fertilização do solo neste modo de produção deve ser realizada recorrendo a práticas de mobilização e práticas culturais que permitam manter e até aumentar a matéria orgânica dos solos, a biodiversidade e que combatam a sua compactação e principalmente a sua erosão.

Para uma boa gestão do solo e da sua fertilidade é importante que cada exploração elabore um plano de fertilização, independentemente do sistema de produção adotado. Estes planos de fertilização devem ser elaborados com base em análises de solo (Saramago, 2009).

2.3.1.2.1. Fertilização orgânica

A matéria orgânica (MO) de um solo é um parâmetro através do qual é possível inferir o efeito das diferentes práticas culturais realizadas ao longo do tempo. Este parâmetro está associado à qualidade do solo, na medida em que influencia a estrutura do solo e por conseguinte a sua capacidade de retenção de água e a disponibilidade de nutrientes para as plantas (Pulleman et al., 2000).

A quantidade de matéria orgânica nos solos constitui um problema nos solos de Portugal. De acordo com Carvalho (2012), mais de 70% dos solos portugueses apresenta um teor de MO inferior a 1%, o que se traduz numa fraca atividade biológica do solo e, por conseguinte, numa reduzida fertilidade dos mesmos.

Em suma, os fenómenos de erosão e a rápida mineralização da matéria orgânica são os fatores associados à reduzida fertilidade dos solos (Carvalho, 2012).

Tal como é referido por Saramago (2009), em agricultura biológica o que se pretende com a fertilização é fechar os ciclos de nutrientes ao nível da exploração. No olival em modo de produção biológico as principais fontes de MO são os adubos verdes, o aproveitamento da lenha de poda e dos subprodutos das explorações agro-pecuárias, como estrume e chorume.

De acordo com o que consta no Regulamento (UE) 2018/848, a quantidade total de estrume animal a utilizar nas produções biológicas não pode ultrapassar o valor limite de 170 kg de azoto por ano e por hectare de superfície agrícola utilizada⁵. A utilização de subprodutos das explorações agro-pecuárias no modo de produção biológico, pressupõe que estes sejam provenientes de unidades de produção biológicas.

Dado que neste modo de produção, um dos aspetos importantes a considerar é o ciclo dos nutrientes dentro da exploração e o aproveitamento dos subprodutos da produção, importa referir os subprodutos dos lagares de azeite e a sua possível utilização na questão da fertilização e correção dos solos.

Estes são produtos com elevada acidez e devido à sua composição em matéria orgânica podem ser agentes de contaminação. No entanto, como também são produtos que apresentam quantidades elevadas de MO e minerais, tornam-se interessantes agronomicamente.

Contudo, a aplicação destes sub-produtos envolve processos de compostagem. A presença de compostos fenólicos e o baixo teor de azoto afetam a disponibilidade deste nutriente para as plantas. A compostagem permite eliminar os compostos fenólicos, aumentar a taxa de mineralização da MO e diminuir a acidez dos subprodutos.

De acordo com o estudo realizado por Sempiterno & Fernandes (2018), a aplicação da água-ruça proveniente dos lagares não apresenta tantos benefícios ao solo como a aplicação do bagaço de azeitona, que está associado a um efeito positivo nos teores de carbono orgânico, teor total de azoto e razão carbono/azoto dos solos.

Rotações plurianuais de culturas com destaque para as culturas leguminosas, como culturas principais ou de cobertura é uma das medidas com destaque na gestão dos solos em Agricultura

⁵ Regulamento (UE) 2018/848: Limite aplicável a estrume, estrume seco e estrume de aves de capoeira desidratado, excremento composto de animais, incluindo estrume de aves de capoeira, estrume composto e excremento líquido de animais.

Biológica. No caso de culturas perenes não forrageiras é recomendado a utilização de culturas para adubação verde (Regulamento (UE) 2018/848).

2.3.1.2.2. Fertilização mineral

Tal como na fertilização orgânica, recorrer à fertilização mineral pressupõe a realização de análises ao solo à priori, de modo a identificar quais as necessidades minerais que não estão a ser asseguradas, de acordo com as medidas que constituem a base do princípio da produção biológica. Se for comprovada a necessidade de fertilização mineral, de acordo com o Regulamento UE 2018/848 e o Regulamento CE 889/2008, é permitido efectua-la.

Agricultura biológica impede a utilização de adubos azotados de síntese mineral.

2.3.1.3. Gestão de Pragas e Infestantes em Agricultura Biológica

Caracterizam-se como infestantes, plantas cujo crescimento ocorre em locais não desejáveis, nomeadamente onde existem culturas de interesse económico instaladas. A grande questão que se coloca com a presença das infestantes, é que estas competem com as culturas por diversos fatores e acabam por afetar o seu rendimento. Os fatores pelos quais as plantas infestantes competem principalmente são: espaço, água, luz solar e nutrientes (Barros & Freixial, 2011).

Nos olivais, o papel das infestantes parece ter duas vertentes. Por um lado, há que considerar o impacto que a competição exercida por estas plantas tem mas, por outro lado, relembrar aspetos positivos que podem adivir da sua presença: o facto de fornecerem uma cobertura do solo que ajuda no combate à erosão dos solos e serem uma fonte de carbono durante o ano inteiro (Rorigues & Cabanas, 2007).

A erosão é um dos principais problemas que afetam a sustentabilidade dos ecossistemas e a presença das infestantes parece contribuir para a sua minimização, uma vez que estas fazem a cobertura dos solos e mantêm a integridade dos mesmos graças ao seu sistema radicular (Rorigues & Cabanas, 2007).

A presença de infestantes é de maior preocupação quando se fala de olivais de sequeiro, pois sendo a água um fator muito limitante tendo em conta o clima mediterrânico de Portugal, a competição por esta pode afetar bastante a produção.

Do ponto de vista técnico, os métodos de controlo de infestantes podem ser preventivos, culturais, físicos, químicos e biológicos. Em agricultura biológica, o controlo químico de infestantes não é autorizado, pelo que é necessário pensar nas outras opções, descritas no Quadro 2.2 (Agrobio, s.d.).

Quadro 2.2 - Métodos alternativos ao controlo químico para a gestão de infestantes no modo de produção biológico.

Métodos	Medidas
Preventivos	Limpeza de sementes
	Limpeza das máquinas utilizadas para mobilizações
	Plantação de sebes para uma maior proteção contra a dispersão de sementes através do vento
Culturais	Rotações de culturas
	Consociações
	Falsas sementeiras
	Adubações verdes
Físicos	Arranque e corte manual
	Corte mecânico
	Mobilização do solo com ou sem enterramento das infestantes
	Monda térmica
	Solarização
	“Mulching” – ensombramento com cobertura do solo
Biológicos	Pastoreio contínuo em estruturas fixas ou móveis
	Pastoreio rotativo em estruturas fixas ou móveis

(Fonte: Agrobio, s.d.)

A questão que se coloca relativamente às mobilizações do solo para controlo das infestantes é que estas afetam a matéria orgânica e levam à sua degradação.

Saramago (2009) refere algumas práticas culturais implementadas nos olivais biológicos que auxiliam no controlo das infestantes. A implementação de sebes e o enrelvamento permanente nas entre-linhas são algumas das práticas mencionadas.

As sebes são estruturas biológicas que auxiliam em diversos aspetos nomeadamente na proteção contra fenómenos de geada, erosão e vento, um dos principais agentes de transporte de

sementes, podendo estas ser de espécies consideradas infestantes (Saramago, 2009).

Algumas vantagens do enrelvamento das entrelinhas são (Saramago, 2009):

- a minimização do processo de erosão dos solos;
- o aumento da quantidade ou da retenção de azoto nos solos (adubos verdes);
- controlo das infestantes; a proteção da fauna auxiliar;

No modo de produção biológico é autorizada a utilização de certas substâncias ativas presentes em produtos fitofarmacêuticos, desde que: estes produtos tenham sido autorizados nos termos do Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, a sua utilização seja realizada de acordo com condições de utilização descritas nas autorizações dos produtos (autorizações que foram concedidas pelos Estados-Membros) e que sejam utilizados de acordo com as condições estabelecidas no anexo do Regulamento de Execução (UE) n.º 540/2011 da Comissão.

A lista de substâncias ativas autorizadas encontra-se no anexo I do Regulamento de Execução (UE) 2021/1165 da Comissão de 15 de julho de 2021. No entanto, as substâncias referidas neste anexo só podem ser utilizadas na luta contra pragas e, caso as medidas de luta a que se dá prioridade neste modo de produção não surtam efeito (agentes de luta biológica – insetos, ácaros, nemátodos úteis).

Substâncias de base obtidas a partir de géneros alimentícios de origem animal ou vegetal podem ser usadas na proteção fitossanitária no modo de produção biológico (sacarose, vinagre, soro de leite, cerveja, pó de sementes de mostarda, óleo de cebola, leite de vaca).

2.3.1.4. Poda

A realização da poda está relacionada com a produtividade das árvores. De modo a conseguir um equilíbrio entre o crescimento e a produção, as oliveiras devem ser podadas regularmente, evitando podas excessivas, excepto quando é necessário haver renovação da copa ou caso a fitossanidade das oliveiras esteja extremamente comprometida (Saramago, 2009).

A poda deve ser realizada antes do início do ciclo das oliveiras, durante o período invernal.

Podem considerar-se três tipos de poda, poda de formação, de produção e de renovação. A poda de formação tem como objetivo a criação de estrutura na árvore, de modo a que as pernas principais tenham um bom posicionamento e orientação (DRAP, s.d.).

Há que considerar que quando as oliveiras são mais jovens, o seu sistema radicular está

mais desenvolvido relativamente à parte aérea, pelo que é necessário ter atenção ao corte (Lourenço et al., 2019).

Na poda de formação é importante que se garanta um bom arejamento da copa, facilitando a entrada de luz. No entanto, deve ser mantido um determinado volume de copa, para que o equilíbrio entre a parte vegetativa e a parte produtiva seja mantida, daí que nesta fase as intervenções sejam frequentes mas ligeiras (DRAP, s.d.).

Segundo Lourenço et al. (2019), quando as oliveiras atingem um certo número de anos, existe um elevado gasto energético para a manutenção das estruturas lenhosas não produtivas, como raízes, troncos e pernadas principais, que acaba por prejudicar a produção das árvores. Nesta situação, deve ser realizada uma poda de rejuvenescimento, eliminando as pernadas principais e assim dando lugar ao crescimento de novas pernadas (DRAP, s.d.). De modo a que não se verifiquem contaminações, as árvores que se encontrem em bom estado fitossanitário devem ser sempre as primeiras a serem podadas.

A lenha de poda das árvores não pode ser aproveitada no momento em que se faz o enterramento do adubo verde, uma vez que esta concentra uma grande quantidade de nutrientes que foram extraídos do solo (Saramago, 2009). A madeira de poda de árvores contaminadas deve ser retirada e destruída.

2.3.1.5. Colheita

A qualidade do azeite é influenciada pela data de colheita. A maturação das azeitonas não ocorre de forma simultânea em todos os frutos. O período de maturação é diferente consoante a variedade, a posição dos frutos nos ramos e a posição na copa. Por esta razão, deve perceber-se quando as azeitonas apresentam o grau de maturação adequado para iniciar a colheita, através da realização de análises de maturação (Lopes et al., 2009).

Como descreve Saramago (2009), o período de maturação é o tempo que decorre entre o aparecimento de manchas violáceas até à coloração definitiva da epiderme e polpa.

O processo de colheita pode ser manual ou mecânico. Por norma, no modo de produção biológico não se recorre à colheita mecanizada com a utilização dos vibradores de tronco mas sim, à colheita manual onde se recorre ao varejamento das árvores.

Na técnica de varejamento, varas provocam a queda dos frutos para panos estendidos no chão, que depois são recolhidos (Lopes et al., 2009).

A técnica de varejamento está associada a alguns aspetos negativos entre os quais (Lopes

et al., 2009):

- cortes nos ramos e nos frutos, o que pode comprometer a fitossanidade dos mesmos e inclusive a qualidade do azeite;
- destruição de ramos produtores o que pode afectar a safra e a contra safra do olival;
- necessidade de grande quantidade de mão-de-obra, que é um dos grandes desafios na agricultura.

Para atenuar o impacto negativo que esta técnica pode ter na produção, o varejamento deve ser realizado do centro da árvore para fora da copa com poucas batidas mas com força, atenuando a danificação dos ramos do ano (Saramago, 2009).

2.3.2. Modo de Produção Integrada

A Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), descreve a produção integrada como um:

... sistema agrícola de produção de produtos agrícolas e géneros alimentícios de qualidade, baseado em boas práticas agrícolas, com gestão racional dos recursos naturais e privilegiando a utilização dos mecanismos de regulação natural em substituição de fatores de produção, contribuindo, deste modo, para uma agricultura sustentável. (DGADR, 2010)

A Produção Integrada baseia-se nos seguintes princípios (DGADR, 2010):

- Regulação e manutenção do ecossistema, importância do bem-estar animal e preservação dos recursos naturais;
- A produção integrada é implementada na exploração agrícola no seu todo;
- Constante atualização do conhecimento técnico dos agricultores relativamente à produção integrada;
- Preservação dos ciclos naturais dentro do ecossistema agrário, como o ciclo dos nutrientes, tentando ao máximo reduzir perdas;
- A proteção das plantas é realizada exclusivamente sob orientação dos princípios da proteção integrada;
- A qualidade dos produtos não está apenas associada a estes como produtos finais, mas a toda a cadeia de produção.

A proteção integrada (PI) é um conceito muito importante na produção integrada.

2.3.2.1. Fertilização

A fertilização em Produção Integrada baseia-se nos princípios da fertilização racional, em que é importante ter em consideração o tipo e as quantidades de fertilizantes a aplicar, em que alturas deve ser realizada a aplicação e com que técnicas, tendo sempre em atenção as necessidades da cultura e o solo (DGADR, 2010).

Devem ser realizadas análises às folhas e ao solo regularmente de modo a conseguir elaborar um plano de gestão da fertilização cuidado (DGADR, 2010).

Na fertilização das oliveiras deve considerar-se uma fertilização de instalação, formação e de produção (DGADR, 2010).

A aplicação de azoto sob a forma de adubo mineral não é permitida na fertilização de instalação, pois este é perdido antes de as plantas conseguirem utilizá-lo. Nas restantes fertilizações, a sua utilização é permitida (DGADR, 2010).

As quantidades máximas de nutrientes que são permitidas aplicar dependem da fase do ciclo de crescimento e produtivo em que as árvores se encontram e da avaliação recorrente do estado nutricional das plantas e do solo (DGADR, 2010).

2.3.2.2. Proteção Fitossanitária

No modo de produção integrado, a proteção fitossanitária rege-se obrigatoriamente pelos princípios da proteção integrada.

A proteção integrada pressupõe a interação de todas as medidas de proteção disponíveis, medidas indiretas (legislativas, genéticas e culturais) e os meios de proteção diretos -luta química, biológica e biotecnológica (DGADR, 2010).

Deve ter-se em conta os níveis económicos de ataque das pragas e realizar sempre uma estimativa do risco.

2.3.3. Modos de Produção e correlação com os Compostos Voláteis em azeite

É importante referenciar que por norma existe uma transição entre os modos de produção, do convencional, para a produção integrada e por fim para o modo biológico. A literatura que existe põe “frente a frente” a produção convencional e o modo de produção biológico, sendo escassa a literatura que tenha como foco a diferenciação destes três modos de produção. O modo de produção biológico e o convencional regem-se por práticas bastante diferenciadas. As práticas na

agricultura biológica visam a promoção da biodiversidade e uma gestão preventiva dos solos. A principal diferença entre o biológico, o convencional e a produção integrada reside na utilização de pesticidas, herbicidas e fertilizantes de síntese.

Assim, o estudo do efeito que as práticas culturais de distintos modos de produção, podem ter na qualidade do azeite, parece pertinente, no entanto, o que se verifica é que existem muito poucos estudos nesta área. Posto isto, cria-se a necessidade de averiguar o tema (Ninfali et al., 2008).

Alguns estudos e publicações indicam que a qualidade dos produtos biológicos, nomeadamente dos frutos em geral parece destacar-se quimicamente e sensorialmente. Ninfali et al. (2008) referem que estes apresentam teores mais elevados de vitamina C e matéria seca, o teor em minerais é mais concentrado e apresentam níveis reduzidos de nitratos. Apesar de serem mais pobres em termos de proteínas, estas são de melhor qualidade.

As culturas obtidas em modo de produção biológico apresentam uma atividade antioxidante mais significativa e teores de compostos fenólicos e vitaminas mais elevados, ao mesmo tempo que os teores em metais pesados são mais reduzidos (Volakakis et al., 2017).

A utilização de produtos de síntese na produção integrada/convencional, pode ter efeito sobre processos metabólicos e na assimilação de nutrientes pelas plantas. Volakakis et al. (2017) refere que a expressão de genes e proteínas pode sofrer alterações significativas quando a fertilização mineral é convertida em fertilização orgânica e quando não se recorre a métodos de luta químicos para proteção das culturas.

No que toca aos parâmetros químicos da qualidade, os azeites biológicos apresentam valores mais baixos de acidez e índice de peróxidos, maior estabilidade e uma classificação mais positiva no contexto organoléptico (Gutiérrez et al., 1999).

Os estudos que comparam a qualidade nutricional de azeites biológicos, convencionais e de produção integrada são escassos e apesar de se saber que as práticas culturais realizadas em agricultura biológica afetam a composição de ácidos gordos de certos alimentos, não se registam diferenças significativas entre os azeites (Volakakis et al., 2017).

López-Yerena et al. (2019) reportam diferenças no perfil fenólico e em componentes bioativos entre azeites biológicos e convencionais. Relaciona-se o facto de na agricultura biológica, as plantas estarem numa situação de maior stress, uma vez que não existe a proteção de pesticidas de síntese e o auxílio nutricional dos fertilizantes sintéticos, a planta tem que aumentar a produção

de metabolitos secundários, entre os quais, os compostos fenólicos.

A análise dos parâmetros químicos da qualidade, ácidos gordos e perfil fenólico dos azeites já foi equacionado como uma estratégia de diferenciação de azeites biológicos e convencionais (López-Yerena et al., 2019; Volakakis et al., 2017) . No entanto, não se conseguiram, até ao momento, resultados que evidenciem uma clara distinção.

A fracção volátil dos azeites é constituída na sua maioria por compostos C₆ e C₅, cuja concentração está diretamente relacionada com atributos positivos associados ao azeite. A concentração destes compostos depende da atividade das enzimas envolvidas na via da lipoxigenase. A atividade destas enzimas é influenciada por diversos fatores, ao invés da sua concentração, que é determinada geneticamente (Angerosa et al., 2004). Os fatores de carácter determinante na atividade destas enzimas estão relacionados com aspetos climáticos e agronómicos.

Relativamente ao fator genético de cada variedade, algumas estão associadas a diferentes níveis de concentração de voláteis. A variedade Leccino, por exemplo, tem uma concentração (ppm) de trans-2-Hexenal (53 ppm) mais elevada do que a Koroneiki (4,9 ppm) e a Gentile di Chieti (7,0 ppm). Desta forma, os compostos voláteis auxiliam a diferenciação das variedades (Angerosa et al., 2004).

A maturação das azeitonas aquando da sua colheita também está relacionado com os compostos voláteis.

O processo tecnológico envolvido na produção de azeite também influencia a presença de compostos voláteis. O aumento no tempo de termobatedura ou o aumento da temperatura, permitem um maior rendimento de azeite na extração mas uma vez que promovem reações de oxidação no azeite, tem efeitos negativos no teor de compostos voláteis e na estabilidade oxidativa (Andrade, 2018).

2.4. Cromatografia gasosa

A cromatografia é uma técnica analítica que permite a separação e/ou purificação de misturas e baseia-se na distribuição ou separação dos compostos entre duas fases, uma fase móvel e uma estacionária (Karasek & Clement, 1988). A cromatografia gasosa (GC), em que se considera uma fase estacionária (pode ser sólida ou líquida) e uma fase móvel gasosa, tem uma ampla utilização como técnica separativa (Forgács & Cserhádi, 2003). De acordo com a solubilidade/afinidade de cada composto em cada uma dessas fases, a separação de cada composto de uma mistura pode ocorrer em diferentes tempos (Karasek & Clement, 1988).

Em particular na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte também denominado gás de arraste, que arrasta os compostos que compõem as misturas em análise, sobre a fase estacionária. Os diferentes compostos da mistura difundem-se a velocidades diferentes em função da sua afinidade com a fase móvel e a fase estacionária, o que os separa uns dos outros para formar um cromatograma. Em seguida, é possível quantificar cada composto, utilizando um detetor. Em termos práticos, em cromatografia mede-se o tempo de retenção (t_r) para cada um dos constituintes de uma mistura (Karasek & Clement, 1988) (Figura 2.8). O tempo de retenção de um dado composto é definido como o intervalo de tempo que o composto permanece na fase estacionária até ser eluído, isto é, corresponde ao intervalo de tempo que medeia a injeção da mistura da deteção de um dado composto, pelo detetor. (Forgács e Cserhádi, 2003).

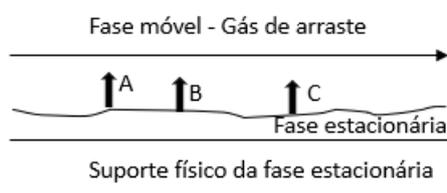


Figura 2.8 - Método de separação por cromatografia gasosa.

(Fonte: Adaptado de Karasek & Clement, 1988)

A fase estacionária é um líquido polimérico com elevado peso molecular que se apresenta depositado nas paredes de um tubo capilar de vários metros de comprimento, constituindo aquilo que são designadas como colunas cromatográficas (Karasek & Clement, 1988).

Assim, os compostos que emergem primeiro da fase estacionária são aqueles que apresentam menor afinidade com esta fase (Karasek & Clement, 1988).

A seleção das colunas capilares a utilizar em cromatografia gasosa deve ser realizada de acordo com a composição da fase estacionária, que, por sua vez, vai depender dos compostos que se pretende isolar (Karasek e Clement, 1988).

Em suma, a cromatografia gasosa permite uma separação dos compostos de uma mistura, a qual está relacionada com os pontos de ebulição destes compostos e com a sua afinidade para a fase estacionária da coluna cromatográfica. Assim, compostos com um ponto de ebulição mais baixo terão um menor tempo de permanência na coluna cromatográfica, acontecendo o oposto para compostos de ponto de ebulição mais elevado. Esta eluição diferencial dos compostos a

períodos distintos, traduz-se em valores numéricos no designado tempo de retenção, i.e., o tempo (em minutos) que medeia a injeção dos compostos e a sua deteção pelo detetor. Este parâmetro será um auxílio para a identificação dos compostos, obviamente conjugado com outros, que serão abordados de seguida.

Em concreto, a simples identificação dos compostos com recurso somente ao parâmetro “tempo de retenção” é possível mediante a análise em condições cromatográficas idênticas de compostos padrão. Contudo, por vezes, isso torna-se difícil devido à indisponibilidade comercial de todos os padrões, aliada ao elevado custo.

Assim, os índices de retenção linear (LRI), também designados por índices de Kovat, surgem como uma ferramenta valiosa que auxilia na identificação dos compostos. Neste trabalho foi efectuada uma identificação com base nos índices de Kovat.

A determinação dos índices de Kovat traduz o comportamento de retenção dos compostos, comparando-o a uma mistura de padrões de alcanos, analisados nas mesmas condições cromatográficas. Neste caso, injetou-se uma mistura de padrões de alcanos (C₁₃-C₂₉) e através da fórmula apresentada em seguida, foram determinados os índices de Kovats para cada composto, que aparece identificado com LRI_{calculado}.

$$I.K = 100 * [(n + (tr - tr_{n-1})) / (tr_{n+1} - tr_{n-1})]$$

2.4.1. Equipamento de cromatografia gasosa

O cromatógrafo gasoso, representado esquematicamente na Figura 2.9, engloba um injetor onde é efectuada a injeção da amostra, a qual poderá ser um gás ou um líquido (neste caso sofre vaporização), ocorrendo, de seguida, o seu arraste com um gás de arraste inerte através de uma coluna cromatográfica (vulgarmente uma coluna capilar). Esta coluna encontra-se localizada no interior de um forno onde a temperatura é controlada e programada, ocorrendo a separação dos constituintes da mistura. Compostos que interagem melhor com a fase gasosa tendem a ter pontos de ebulição mais baixos (são voláteis) e pesos moleculares baixos, enquanto compostos que preferem a fase estacionária tendem a ter pontos de ebulição mais altos ou são mais pesados. Outros fatores que afetam a progressão dos compostos na coluna incluem a polaridade e a temperatura do forno. Após os compostos serem separados e eluídos da coluna, o gás de arraste transporta-os para o detetor. O detetor detetará a presença destes compostos, originando um gráfico de intensidade versus tempo de retenção, denominado de cromatograma. No caso da Figura 2.9, o detetor acoplado ao cromatógrafo gasoso é um espectrómetro de massa.

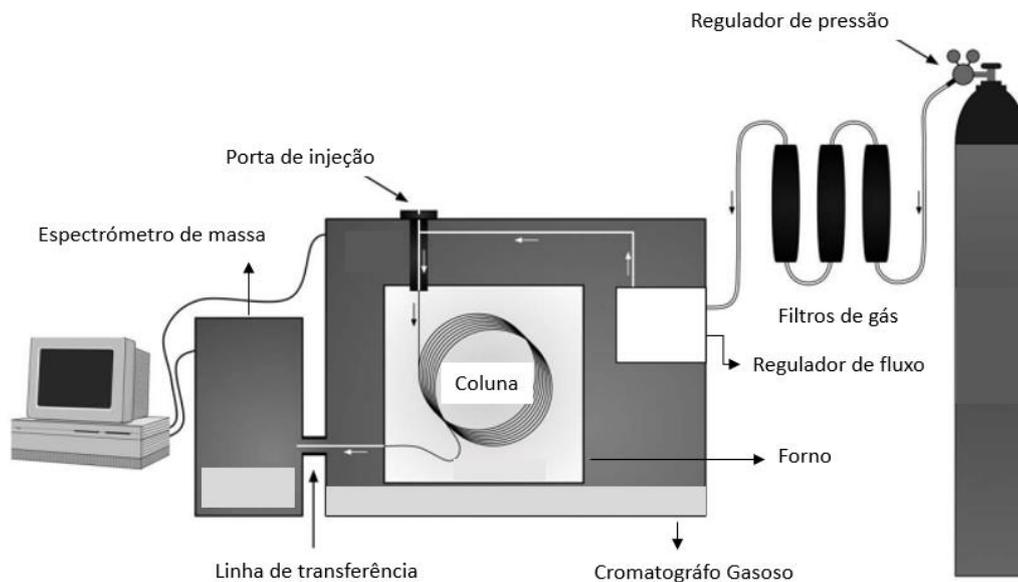


Figura 2.9 - Representação esquemática de um cromatógrafo gasosos acoplado à espectrometria de massa.

(Fonte: Forgács & Cserhádi, 2003)

A cromatografia é uma técnica que permite separar de forma rápida e com elevada eficácia moléculas com características semelhantes a partir de matrizes complexas, como é o caso do azeite (Forgács & Cserhádi, 2003).

Forgács & Cserhádi (2003) chamam à atenção o facto de que existem limitações no que toca à utilização da cromatografia gasosa e ao tipo de moléculas que se pretende analisar. Sendo uma técnica que envolve procedimentos a elevadas temperaturas, é essencial que os compostos se volatilizem sem que ocorra a degradação dos mesmos e que não sofram reações quando em contacto com as fases estacionária e móvel.

2.4.1.1. Colunas

As colunas utilizadas em cromatografia gasosa são de dois tipos: capilares ou empacotadas (Forgács & Cserhádi, 2003). Contudo, atualmente, para a maioria das aplicações são utilizadas colunas capilares.

As colunas capilares são tubos cujo diâmetro interno é de dimensões muito reduzidas e que são de vidro ou de sílica. No interior destes tubos está uma camada da fase estacionária, cuja composição química e espessura da camada de revestimento é muito importante, dada a sua influencia na separação dos compostos (Forgács & Cserhádi, 2003).

A grande vantagem destas colunas capilares é a sua elevada capacidade de separação dos compostos (Forgács & Cserhádi, 2003).

A coluna cromatográfica é um elemento do equipamento de cromatografia de grande importância, uma vez que é nesta que a separação dos analitos ocorre, pelo que se torna essencial fazer uma seleção adequada da coluna a utilizar.

É necessário ter em atenção a composição química da fase estacionária, pois é com esta que os analitos interagem e esta interação permitirá uma separação eficiente dos compostos de uma mistura (Stauffer et al., 2008).

No Quadro 2.3 estão indicadas algumas das fases estacionárias mais utilizadas e a sua aplicação.

Quadro 2.3 - Fases estacionárias mais utilizadas em colunas cromatográficas e respetiva aplicação.

Composição da Fase Estacionária	Aplicação
100% dimetilpolissiloxano	Compostos não polares
5% fenilpolissiloxano 95% dimetilpolissiloxano	Compostos não polares
35% fenilpolissiloxano 65% dimetilpolissiloxano	Compostos polares
50% fenilpolissiloxano 50% dimetilpolissiloxano	Compostos polares
14% cianopropil-fenilpolissiloxano 86% dimetilpolissiloxano	Compostos polares
Polietileno glicol (PEG)	Compostos com elevada polaridade

(Fonte: Adaptado de Stauffer et al., 2008)

2.5. Espectrometria de Massa

Stauffer et al. (2008) relembram o facto de a cromatografia gasosa não ser um método analítico por si só, é apenas uma técnica de separação. Posto isto, é necessário, que neste processo exista um aparelho que permita a deteção dos dados que advém da separação dos compostos por cromatografia gasosa. Um espectrómetro de massa é um detetor que pode ser conectado ao equipamento de cromatografia e que permite efetuar a identificação de compostos, com base no seu espectro de massa.

No espectrômetro de massa, os compostos eluídos da coluna cromatográfica sofrem ionização e, por conseguinte, são fragmentados em íons de menor dimensão, que de acordo com a sua razão de massa /carga (m/z), são organizados e posteriormente detectados, obtendo-se o respetivo espectro de massa (Figura 2.10) que é característico de um determinado composto químico.

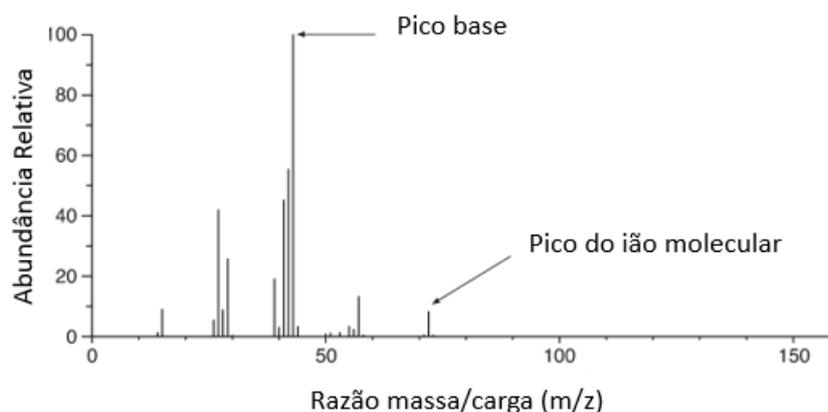


Figura 2.10 - Representação de um espectro de massa.

(Fonte: Adaptado de Stauffer et al., 2008)

O pico que aparece de forma mais intensa no espectro ou o pico base é normalizado a 100% e todos os outros picos representam uma percentagem do pico base.

2.6. Desconvolução em GC-ToF-MS

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação muito eficaz quando se trata de matrizes complexas. Quando acoplada a espectrometria de massa, o seu poder de resolução aumenta pois, permite obter dados para uma identificação mais segura dos analitos (Jalali-Heravi, M., & Parastar, H. (2010)).

Esta técnica, que permite a separação e identificação dos compostos é apontada como uma das mais utilizadas em diversas áreas científicas devido a um número de características que lhe permite uma maior eficácia na separação e identificação tanto em matrizes mais simples como em matrizes de maior grau de complexidade. Jalali-Heravi, M., & Parastar, H. (2010) enunciam algumas das características desta técnica: elevada sensibilidade, limite baixo de deteção, permite a análise de um elevado número de analitos e a espectrometria de massa permite a identificação dos mesmos.

No entanto, uma das situações que ocorre com frequência neste tipo de análise é que devido à elevada complexidade das amostras ou quando são realizados “tempos de corrida” /tempos de análise rápidos, a separação dos compostos pode não atingir o grau pretendido e haver sobreposição de picos. A esta sobreposição de picos de deteção denomina-se coeluição. Como a identificação dos compostos é realizada por intermédio de uma comparação com dados já existentes em bibliotecas de espetros de massa, quando os compostos são co-eluídos e os picos estão em sobreposição, uma identificação que seja o mais real e fidedigna possível, fica dificultada (Jalali-Heravi, M., & Parastar, H., 2010).

Uma forma de solucionar esta questão passa pela técnica de desconvolução. Segundo Du, X., & Zeisel, S. H. (2013), desconvolução é uma técnica computacional que permite separar componentes que sofreram coeluição durante a separação por cromatografia gasosa. O programa de software associado à técnica de cromatografia gasosa, permite desconstruir a sobreposição de picos que ocorreu e identificar os compostos correspondentes.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

No trabalho foram utilizadas amostras de 11 azeites virgem-extra de três variedades: Galega, Cobrançosa e Arbequina, provenientes de produção integrada e produção biológica, produzidos em olivais da região do Alentejo (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 - Designação dos azeites cedidos para o estudo por variedade e modo de produção (Azeites em modo de produção biológico indicados com * e Azeites em modo de produção integrada indicados a negrito).

Azeite	Variedade	Modo de Produção	Zona geográfica
A	Galega	Produção Integrada	Vidigueira
B	Galega	Produção Integrada	Reguengos de Monsaraz
<u>C</u> *	Galega	Biológico	Sousel
<u>D</u> *	Galega	Biológico	Redondo
E	Arbequina	Produção Integrada	Pias
<u>F</u> *	Arbequina	Biológico	Reguengos de Monsaraz
G	Cobrançosa	Produção Integrada	Pias
H	Cobrançosa	Produção Integrada	Vidigueira
I	Cobrançosa	Produção Integrada	Vidigueira
<u>J</u> *	Cobrançosa	Biológico	Alter-do-Chão
<u>K</u> *	Cobrançosa	Biológico	Reguengos de Monsaraz

Os azeites utilizados neste trabalho foram produzidos na Herdade do Esporão, com azeitonas provenientes de olivais da região Alentejo, conforme indicado no Quadro 3.1. Os azeites do estudo foram armazenados em recipientes de plástico escuros (cor âmbar) de modo a evitar ou minimizar processos de degradação dos azeites, nomeadamente a foto-oxidação.

3.2. Métodos

3.2.1. Parâmetros Químicos da Qualidade

A categorização comercial dos azeites assenta numa análise dos parâmetros químicos da qualidade (nomeadamente grau de acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos) em conjunto com uma análise sensorial ou prova organolética. Assim, para cada um dos azeites em estudo, foram determinados os parâmetros químicos da qualidade. É de referir que a análise sensorial não foi realizada no âmbito deste trabalho, uma vez que requer um painel de provadores treinado para a prova organolética dos azeites.

As determinações foram realizadas em triplicado de modo a ser possível calcular a média e o desvio padrão para cada um dos azeites.

3.2.1.1. Acidez

A determinação da acidez foi realizada de acordo com o Regulamento (CEE) Nº 2568/91. Para um valor de acidez presumido entre 0 e 2 g de ácido oleico/100 g, o peso da toma de azeite considerado foi de 10 g.

A determinação da acidez baseia-se numa titulação ácido-base, utilizando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), de concentração rigorosamente conhecida, como base. Desta forma, foi preparada uma solução de NaOH, com uma concentração de 0,5 M e como indicador utiliza-se uma solução de fenolftaleína, como descrito na Figura 3.1.

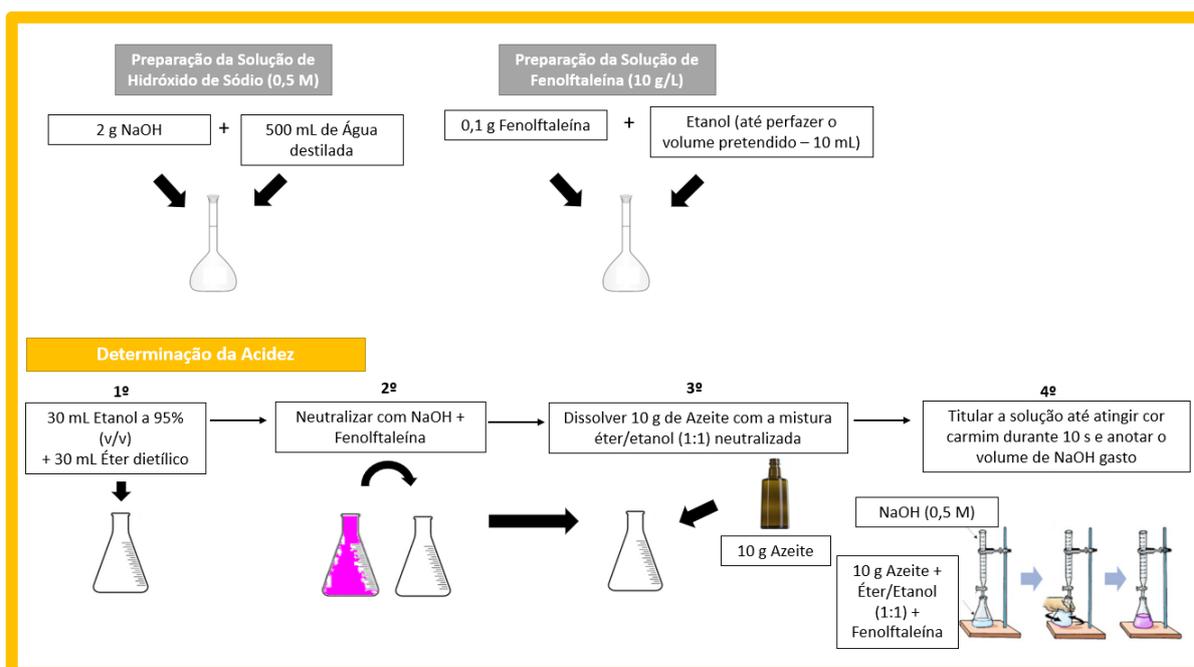


Figura 3.1 - Fluxograma do procedimento para a determinação da acidez no azeite.

Para a preparação da solução de NaOH, o volume pretendido de solução foram 500 mL com uma concentração de 0,1 M. Para obter a concentração e o volume desejados, a massa de NaOH a pesar eram 2 g. No entanto, como não foram pesados exatamente 2 g de NaOH, foi necessário fazer uma correção da concentração da solução obtida. Assim, para a titulação utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio com uma concentração de 0,5 M.

Na titulação, a fenolftaleína funciona como indicador ácido-base permitindo a visualização do ponto de equivalência através da mudança de cor, do titulado, de incolor para carmim. Preparou-se um volume de 10 mL com uma concentração de 10 g/L (em etanol).

À toma de azeite referida adicionou-se 60 mL da mistura de etanol e éter dietílico (1:1 (v/vv)), que foi previamente neutralizada com a solução de NaOH.

Em seguida, realizou-se a titulação com a solução de NaOH e registou-se o volume de titulante gasto.

A acidez é calculada utilizando a expressão matemática:

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

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

V – Volume de hidróxido de sódio (0,5 M) gasto na titulação (em mL)

m – Massa da toma de azeite (em g)

2,82 – Fator resultante de expressar a acidez em % de ácido oleico, atendendo à massa molecular do ácido oleico.

3.2.1.2. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado de acordo com o descrito no anexo III do Regulamento (CEE) Nº 2568/91 da Comissão de 11 de julho de 1991. A toma de azeite considerada para o ensaio foi de 2 g, para um índice de peróxidos presumido (meq O₂/Kg azeite) entre 0 e 12.

Pesaram-se 2 g de azeite para um balão erlenmeyer e adicionou-se 10 mL de clorofórmio para permitir a solubilização do azeite. De seguida, com uma pipeta volumétrica, mediu-se 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL da solução saturada de iodeto de potássio previamente preparada. Após a adição de água destilada e o amido (que funcionada como indicador na reação), foi realizada a titulação e o volume de titulante gasto (tiosulfato de sódio) foi anotado para a realização dos cálculos (Figura 3.2.)

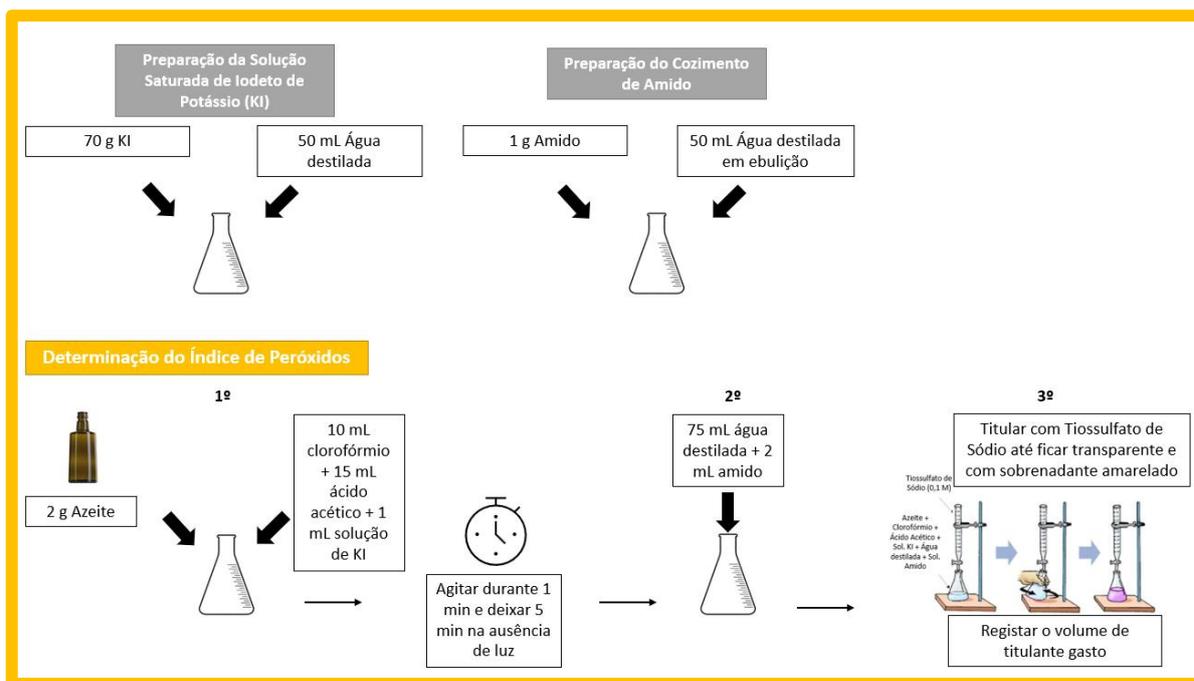


Figura 3.2 - Fluxograma do procedimento para a determinação do índice de peróxidos no azeite.

O valor do índice de peróxidos (IP) para cada uma das amostras, foi calculado usando a expressão matemática:

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

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

V – Volume de tiosulfato gasto na titulação (em mL)

M – Molaridade da solução de tiosulfato de sódio (M)

m – Massa da toma de azeite (em grama)

3.2.1.3. Índices Espectrofotométricos

Os índices espectrofotométricos ou coeficientes de extinção foram determinados de acordo com o descrito no anexo IX do Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 da Comissão de 12 de outubro de 2015, apenas com uma alteração: a toma de azeite foi de 0,1 g para um balão volumétrico aferido de 10 mL.

O solvente orgânico utilizado foi o iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) e como tal, foi medida a absorvância das soluções aos comprimentos de onda de 232, 264, 268 e 272 nm.

Para um balão volumétrico aferido de 10 mL, pesaram-se 0,100 g de amostra de azeite, que foi diluído com a adição do solvente orgânico (iso-octano).

Antes da análise da amostra no equipamento, é necessário realizar o ensaio em branco. Numa célula de quartzo foi colocado o solvente orgânico utilizado, a célula foi colocada no espectrofotómetro e realizou-se um varrimento nos seguintes comprimentos de onda: de 232, 264, 268 e 272 nm.

Após o ensaio em branco, a célula foi preenchida com a amostra de azeite que se pretendeu analisar e foi feito um novo varrimento na gama de comprimentos de onda mencionados. Os valores da absorvância obtidos para cada um dos comprimentos de onda foram anotados para a realização dos cálculos (Figura 3.3).

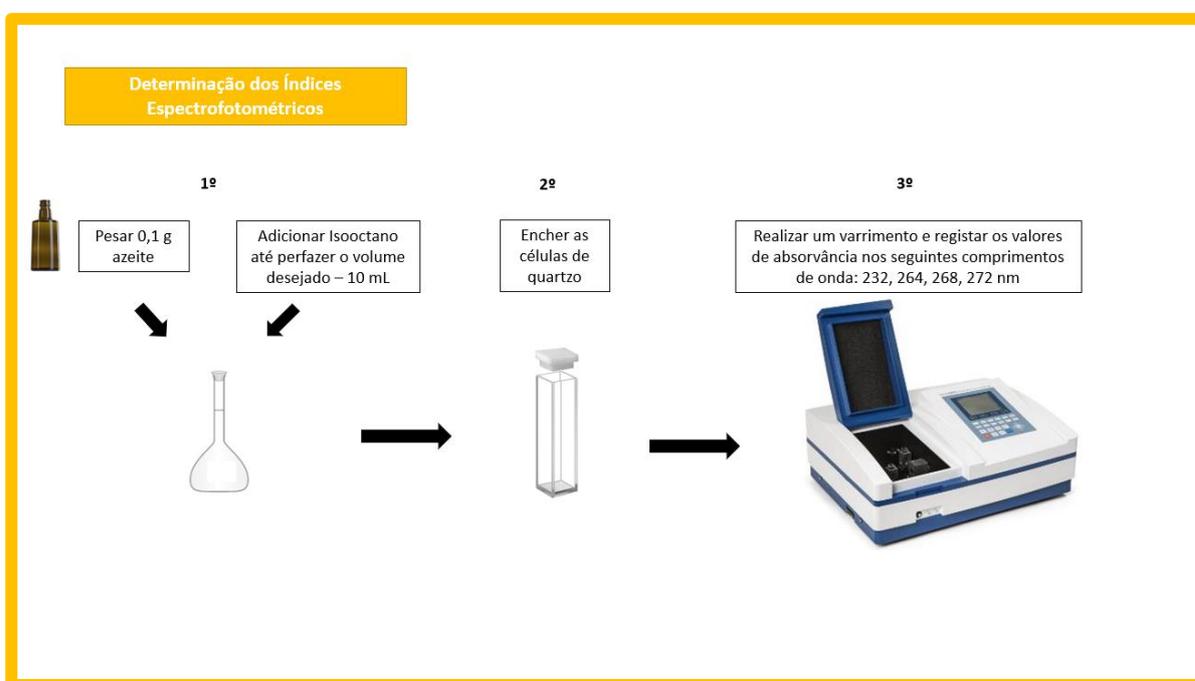


Figura 3.3 - Fluxograma do procedimento para a determinação dos índices espectrofotométricos no azeite.

Os coeficientes de extinção foram calculados utilizando a expressão matemática:

$$K\lambda = \frac{A\lambda}{c \times l}$$

$$\Delta K = |K_{268} - [(K_{264} + K_{272})/2]|$$

Onde:

λ - Comprimento de onda (nm)

K_λ – coeficiente de extinção a um determinado comprimento de onda

A_λ - valor da absorvância num determinado comprimento de onda

c – Concentração da solução (g/100 mL)

l – Percurso ótico na célula de quartzo (cm)

3.2.2. Compostos Voláteis

As determinações dos compostos voláteis, nas amostras de azeite em estudo, foram realizadas recorrendo à técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-TOF- MS).

3.2.2.1. Técnica de preparação de amostra

A técnica de preparação de amostra que foi aplicada neste trabalho foi a Microextração em fase sólida no espaço de cabeça (do inglês *Headspace Solid Fase Microextraction (SPME)*).

Para a preparação das amostras para análise, procedeu-se do seguinte modo: em frascos de vidro roscados de 10 mL de cor âmbar, pesaram-se cerca de 3 g de azeite e 0,6 g de cloreto de sódio (NaCl). A adição do NaCl tem como objetivo promover a ocorrência do fenómeno de *salting-out*, proporcionando a libertação dos compostos voláteis. Os frascos foram devidamente tapados com tampas adequadas para a utilização das fibras. As amostras foram preparadas em triplicado, pelo que no total, foram analisadas 33 amostras.

Em seguida, as amostras foram colocadas no módulo amostrador automático, sendo analisadas sequencialmente. O frasco, contendo a amostra de azeite em análise, é transportado para a unidade de agitação e aquecimento onde sofre um processo de aquecimento a 50 °C e uma agitação a 250 rpm, durante 5 minutos, para a promover a volatilização dos compostos para o espaço vazio entre a superfície do azeite e a tampa do frasco, denominado de “espaço de cabeça”.

De seguida, foi introduzida a fibra nos frascos e exposta, durante 30 minutos a uma temperatura de 50 °C, aos compostos voláteis que volatilizaram para o “espaço de cabeça”, de modo a promover a adsorção dos compostos à fibra. A fibra utilizada foi uma fibra tripla revestida com polidimetilsiloxano, divinilbenzeno e carboxeno (PDMS/ DVB/ CAR), com 1 cm de comprimento e uma espessura de 50/30 μm , fornecida pela empresa Supelco.

Decorrido esse tempo, a fibra é recolhida, transportada para o injetor do GC e exposta a uma temperatura de 260 °C, durante 3 minutos onde ocorrerá a desadsorção dos compostos voláteis retidos pela fibra. As injeções foram feitas em modo *splitless*, com um fluxo constante de 1,3 mL·min⁻¹, utilizando hélio como gás de arraste. Os compostos são conduzidos para a coluna cromatográfica que se encontra num forno, no qual ocorre o seguinte gradiente de temperaturas: temperatura inicial de 50 °C durante 5 minutos, com um aumento da temperatura de 4 °C/min até atingir os 240 °C, onde esta temperatura se manteve durante 10 minutos. O tempo total de análise total é de 62,5 minutos.

Sequencialmente, os compostos eluídos da coluna cromatográfica são transferidos para o espectrómetro de massa através da *transfer line* (T. *transfer line* = 250 °C; T. *ion source* = 250 °C) e analisados no espectrómetro de massa, num intervalo de razão massa/carga (*m/z*) de 30 a 400 *m/z*, com ionizações a 70 eV. O software utilizado na aquisição dos dados foi TOF-DS 4.1 (MARKES International).

3.2.2.2. Análise por cromatografia gasosa – espectrometria de massa

A identificação dos compostos foi efectuada mediante o cálculo dos índices de Kovats e comparação destes com os valores referenciados na literatura (atendendo ao tipo de coluna utilizada). Foi ainda realizada a comparação do espectro de massa de cada composto com a base de espetros de massa da base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

As análises foram efetuadas num sistema de GC-TOF/MS, que consiste num cromatógrafo gasoso Agilent 8890GC acoplado a um detetor BenchTOF-Select, da empresa Markes International. Além destes, o equipamento é composto por um amostrador automático ou PAL, CTC Analysis, (SepSolve Analytical).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna polar da marca Agilent com as seguintes características: 60 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de 0,25 µm.

Para a identificação de alguns compostos voláteis foram utilizados os padrões Heptanal, octanal, (E)-2-Heptanal, nonanal, (E)-2-Octenal, (E)-2-Decenal, que já se encontravam disponíveis no laboratório e que tinham sido adquiridos à empresa Sigma-Aldrich.

3.2.3. Análise Estatística

Para avaliar a existência de possíveis compostos diferenciadores do modo de produção do azeite realizou-se uma análise estatística com recurso ao programa IBM SPSS Statistics, versão 26 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). De modo a tornar os resultados mais representativos, os azeites foram agrupados de acordo com o seu modo de produção (1- Produção Integrada; 2 – Produção Biológica).

Para a avaliação da existência de possíveis compostos diferenciadores, considerou-se o modo de produção, “Biológico-1” e “Integrado-2”, como variável independente, e realizou-se uma análise de variâncias (ANOVA), com teste de comparação de médias LSD ($\alpha= 0.05$).

Adicionalmente, foi realizada uma ANOVA para a caracterização de possíveis diferenças entre as variedades em estudo (Galega, Cobrançosa e Arbequina). Neste caso, a “Variedade”, foi considerada como variável independente.

Com os resultados obtidos na ANOVA foi elaborada uma tabela, onde as diferenças significativas estão assinaladas com recurso a letras diferentes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Parâmetros químicos da qualidade

4.1.1. Acidez

O teor de acidez nos azeites está relacionado com a degradação dos triacilgliceróis que posteriormente resulta na formação dos ácidos gordos livres, tal como refere Conceição (2020). Estas reações de degradação são influenciadas pelo estado sanitário dos frutos e pelas práticas na colheita e no lagar (Conceição, 2020).

Na Tabela 4.1 está representado o teor de acidez, expresso em percentagem de ácido oleico, para cada uma das amostras de azeite em estudo, de acordo com o modo de produção e variedade.

Tabela 4.1 - Teores de acidez para os azeites em estudo, de diferentes variedades e modo de produção.

Modo de Produção					
Produção Integrada			Biológico		
Azeite	Variedade	Acidez	Azeite	Variedade	Acidez
A	Galega	0,27 ± 0,03	<u>C*</u>	Galega	0,17 ± 0,00
B	Galega	0,20 ± 0,02	<u>D*</u>	Galega	0,15 ± 0,02
E	Arbequina	0,18 ± 0,02	<u>F*</u>	Arbequina	0,16 ± 0,01
G	Cobrançosa	0,26 ± 0,04	<u>J*</u>	Cobrançosa	0,29 ± 0,02
H	Cobrançosa	0,34 ± 0,05	<u>K*</u>	Cobrançosa	0,22 ± 0,03
I	Cobrançosa	0,22 ± 0,00			

Relativamente à tabela anterior, é possível concluir que os teores de acidez dos 11 azeites analisados são inferiores ao limite máximo que consta no Regulamento (UE) 2022/2104⁶ para os azeites da categoria virgem extra, onde a percentagem de ácido oleico deve ser igual ou inferior a 0,80%.

⁶ Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 da Comissão de 29 de julho de 2022 que complementa o Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante às normas de comercialização do azeite e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão e o Regulamento de Execução (UE) n.º 29/2012 da Comissão

Contudo, os azeites Cobrançosa H, Galega A e Cobrançosa J* destacam-se com os valores de acidez mais elevados, compreendidos no intervalo 0,27% - 0,34%.

O azeite Galega D*, proveniente do modo de produção biológico, é o que apresenta o menor valor de acidez.

Os azeites biológicos parecem atender a uma tendência de valores de acidez mais baixos do que os azeites de produção integrada, à exceção do Cobrançosa J* e Cobrançosa K*, com valores mais semelhantes ao que se obteve no Modo de Produção Integrado (MPI).

Ao contrário do observado neste estudo, Volakakis et al. (2022), num estudo de 3 anos sobre o efeito dos sistemas de produção (Biológico vs. Convencional) na produtividade das oliveiras e qualidade do azeite da variedade Koroneiki, verificaram que a acidez 9% superior em azeites de produção biológica, relativamente aos azeites de produção convencional.

4.1.2. Índice de Peróxidos

A formação de produtos primários de oxidação (peróxidos) resulta da oxidação dos ácidos gordos insaturados livres, comprometendo o tempo de vida útil dos azeites. Tal como na acidez, este parâmetro vai depender do estado em que o fruto é colhido e das condições em que armazenado (Salgueiro et al., 2019).

Tabela 4.2 - Valores de índice de peróxidos para os azeites em estudo.

Modo de Produção					
Produção Integrada			Biológico		
Azeite	Variedade	Índice de Peróxidos	Azeite	Variedade	Índice de Peróxidos
A	Galega	6,09 ± 0,28	<u>C*</u>	Galega	11,06 ± 0,74
B	Galega	5,75 ± 0,34	<u>D*</u>	Galega	12,51 ± 0,60
E	Arbequina	6,46 ± 0,52	<u>F*</u>	Arbequina	10,31 ± 0,78
G	Cobrançosa	11,20 ± 0,26	<u>J*</u>	Cobrançosa	9,88 ± 0,97
H	Cobrançosa	10,56 ± 1,30	<u>K*</u>	Cobrançosa	10,16 ± 0,18
I	Cobrançosa	14,64 ± 0,45			

No que diz respeito ao índice de peróxidos (I.P), todas as amostras apresentam valores inferiores ao valor máximo legislado (20 mEq O₂/kg).

Os azeites A, B e E (MPI), destacam-se dos restantes, por terem valores mais baixos.

Carrapiso et al (2020), constataram que na variedade Verdial de Badajoz, o modo de produção teve uma influência notável neste parâmetro químico. Os azeites de produção biológica tinham valores de I.P. mais baixos do que os azeites obtidos através do modo convencional.

Neste caso, verificou-se que os valores de I.P são mais baixos apenas para três dos azeites, que neste caso correspondem a azeites de produção integrada. Tanto os azeites Cobrançosa de produção integrada como todos os azeites de produção biológica, apresentam valores muito idênticos.

4.1.3. Índices Espectrofotométricos

A oxidação dos azeites leva à formação de hidroperóxidos (produtos primários da oxidação) e a aldeídos e cetonas (produtos secundários da oxidação). Estes produtos da oxidação apresentam picos de absorvância a diferentes comprimentos de onda na região do ultravioleta (UV), e é possível identificá-los e perceber a intensidade da sua presença no azeite (Volakakis et al., 2022). A absorvância a 232 nm está relacionada com os produtos primários da oxidação e a 268 nm, com os produtos secundários da oxidação (Custódio, 2009). Os valores obtidos para estes azeites, estão bastante abaixo do limite máximo, pelo que se conclui que os fenómenos de oxidação ainda não são expressivos nestas amostras.

Tabela 4.3 - Valores de K₂₃₂, K₂₆₈ e ΔK nos azeites de modo de produção biológico e produção integrada.

Modo de Produção									
Produção Integrada					Biológico				
Azeite	Variedade	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK	Azeite	Variedade	K ₂₃₂	K ₂₆₈	ΔK
A	Galega	0,24±0,03	0,14±0,00	0,00±0,00	<u>C*</u>	Galega	0,24±0,02	0,15±0,00	0,01±0,00
B	Galega	0,11±0,02	0,10±0,00	0,01±0,00	<u>D*</u>	Galega	0,29±0,02	0,13±0,00	0,00±0,00
E	Arbequina	0,05±0,03	0,11±0,01	0,01±0,00	<u>F*</u>	Arbequina	0,25±0,03	0,13±0,00	0,00±0,00
G	Cobrançosa	0,16±0,02	0,16±0,00	0,01±0,00	<u>J*</u>	Cobrançosa	0,27±0,00	0,18±0,00	0,01±0,00
H	Cobrançosa	0,13±0,02	0,12±0,00	0,01±0,00	<u>K*</u>	Cobrançosa	0,27±0,03	0,17±0,00	0,01±0,00

O Regulamento (UE) 2022/2104 da Comissão de 29 de julho de 2022, apresenta os valores máximos permitidos para os coeficientes espectrofotométricos ou coeficientes de extinção para os comprimentos de onda de 232 nm, 268 nm e para o ΔK , para as diversas categorias comerciais de azeite. Relativamente ao azeite virgem extra, os valores são: $K_{232} \leq 2,50$, $K_{268} \leq 0,22$ e $\Delta K \leq 0,01$.

Verifica-se que todos os azeites analisados apresentam valores de K_{232} bastante inferiores ao valor máximo legislado de 2,50. O mesmo acontece para o valor de K_{268} .

O valor de ΔK para os azeites analisados está em conformidade com o valor legislado no regulamento ($\leq 0,01$), com desvio padrão nulo.

Entre modos de produção, não é possível estabelecer uma relação entre os índices espectrofotométricos, com os resultados obtidos. Volakakis et al. (2022), verificaram o mesmo num estudo de três anos com azeites de produção biológica e produção convencional, o modo de produção parece não apresentar efeito ao nível dos parâmetros químicos da qualidade, pelo menos não tanto, quanto outros fatores, como a variação anual e a localização dos olivais.

Em suma, é possível observar que todas as amostras de azeite em estudo apresentam valores para os parâmetros químicos da qualidade (acidez, índice de peróxidos e índices espectrofotométricos) muito abaixo dos valores máximos legislados, o que permite classificá-los como azeite virgem extra. No entanto, a atribuição desta classificação depende também da realização de uma prova sensorial por parte de um painel de provadores.

Contudo, é de realçar que tendo em conta os parâmetros analisados, em ambos os modos de produção, foram obtidos azeites com padrões de qualidade elevados.

Estudos realizados por Carrapiso et al. (2020) indicaram que, parece não existir um efeito do tipo de produção (biológico versus convencional) nos parâmetros químicos da qualidade. Assim, sugeriram que a falta de um efeito visível nos parâmetros químicos dos azeites poderia estar relacionada com semelhança entre as práticas agrícolas. Pois apesar de obtidos por modos de produção diferentes (biológico e convencional), o fator que mais impacto poderia ter, seria a fertilização. Mas tanto no caso do trabalho mencionado como neste trabalho, não parece haver uma diferença clara na qualidade química dos azeites de produção biológica e produção integrada.

Arbonés et al. (2020), numa revisão de vários artigos relacionados com esta temática, concluíram que uma fertilização azotada em excesso leva a uma redução no teor total de fenóis nos azeites, seja qual for o sistema de produção considerado e a cultivar em questão. A questão dos fenóis é também um ponto importante uma vez que um azeite com um teor de fenóis elevado, espera-se que tenha um tempo de vida útil de prateleira maior (Salgueiro et al. 2019).

Em 1999, Gutiérrez et al., tentaram identificar diferenças na qualidade do azeite virgem extra da variedade Picual cultivada em dois modos de produção diferentes, “ecológico” e convencional. Neste estudo, no modo de produção caracterizado como ecológico, a fertilização foi realizada recorrendo a compostagem e estrume. No modo convencional a fertilização foi feita com fertilizantes minerais, a gestão de pragas recorrendo a luta química e o controlo de infestantes, à base de herbicidas, nomeadamente o glifosato.

Foram analisados os parâmetros químicos da qualidade (acidez, índice de peróxidos e os coeficientes de extinção), os ácidos gordos, o teor de esteróis, polifenóis e tocoferóis e a estabilidade oxidativa dos azeites. A análise sensorial também foi realizada.

Com este estudo, Gutiérrez et al. (1999) obtiveram resultados diferentes ao nível dos parâmetros químicos da qualidade. Os azeites obtidos de modo “ecológico” apresentaram uma qualidade superior no sentido em que obtiveram valores de acidez e índice de peróxidos mais baixos e uma estabilidade oxidativa e avaliação organolética superior ao azeite do modo convencional.

Assim, o que parece realçar-se com estes estudos é que o efeito dos modos de produção nos parâmetros químicos da qualidade não é consensual.

4.2. Composição volátil dos azeites

Com a utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-ToF-MS), foi possível analisar as 11 amostras de azeite em estudo neste trabalho. Esta técnica permitiu separar e identificar um total de 84 compostos voláteis, que foram agrupados de acordo com a sua classe química, de modo a facilitar a análise dos resultados. A Figura 4.1 representa um dos vários cromatogramas obtidos e que posteriormente facilitaram a análise dos compostos voláteis.

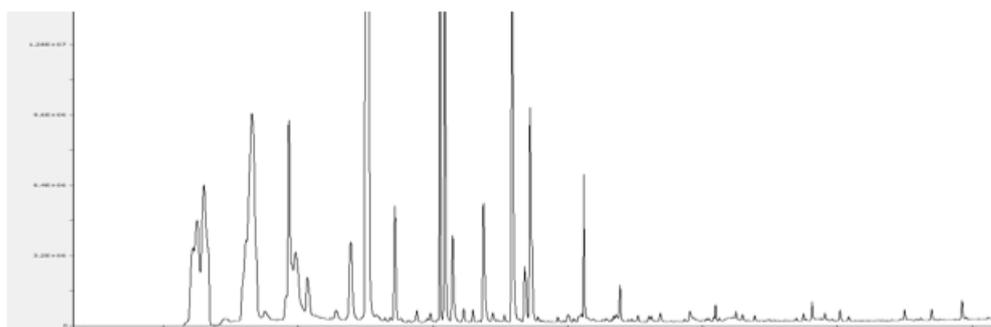


Figura 4.1 - Cromatograma da amostra de azeite da variedade Galega obtido por HS-SPME – GC-TOF/MS.

As classes químicas que mais se destacaram foram os aldeídos, os álcoois e os ésteres, devido ao maior número de compostos voláteis identificados.

Nas Tabelas 4.4 a 4.10 constam os compostos voláteis que foram identificados, organizados de acordo com a classe química, com o respetivo tempo de retenção e informação relativa ao valor de índice de retenção linear (LRI) e fragmentos que permitem uma maior certeza na sua identificação.

Na tabela encontram-se indicados compostos voláteis que apresentam isomeria, e que foram identificados recorrendo à comparação com padrões comerciais.

A identificação dos restantes compostos foi realizada por comparação dos espectros que constam na biblioteca NIST.

Tabela 4.4 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos aldeídos.

Aldeídos				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
(E)-2- Pentenal	13,75	55/59/84	-	1130
3-Hexenal [Ⓞ]	14,89	41/69/55	-	1130
3-Hexenal [Ⓞ]	15,71	41/69/55	-	1130
Heptanal [Ⓦ]	16,39	44/70/55	-	1188
2-Hexenal [Ⓞ]	16,95	41/55/83/6	-	1216

[Ⓞ] Isómero

[Ⓦ] Confirmado com padrão comercial

2-Hexenal [Ⓟ]	17,53	41/55/69	-	1218
Octanal ^ω	19,89	41/43/57/8	-	1291
(E)-2-Heptenal ^ω	21,13	41/83/55/7	1330	1336
Nonanal ^ω	23,39	57/41/70/9	1398	1391
2,4-Hexadienal [Ⓟ]	23,44	81/39/96	1399	1404
(E)-2-Octenal ^ω	24,62	41/70/83	1436	1434
2,4-Heptadienal	26,61	81/110	1498	1497
Benzaldeído	27,60	77/105/51	1530	1520
4-Oxohexenal	29,52	83/52/112	1593	⁷
(E)-2-Decenal	31,23	41/43/70/8	1651	1644

Tabela 4.5 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos álcoois.

Álcoois				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
1-Penten-3-ol	15,33	57/29/27	-	1164
1-Pentanol	18,41	42/55/70	-	1255
2-Penten-1-ol [Ⓟ]	20,73	57/41/44	1317	1325
Acetato de 3-Hexen-1-ol [Ⓟ]	20,74	43/67/82/41	1318	1316
1-Hexanol	21,86	56/43/41/69	1352	1356
3-Hexen-1-ol	22,22	41/67/82	1362	1387
2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	22,39	43/59/101	1368	1351
3-Hexen-1-ol [Ⓟ]	22,93	41/67/82	1384	1382

⁷ Não foi identificado na literatura o valor de LRI para este composto.

2-Hexen-1-ol [Ⓞ]	23,59	57/41/82	1404	1406
2-Hexen-1-ol [Ⓞ]	23,89	57/41/82	1413	1406
1-(2-metoxi-1-metiletóxi) -2-Propanol	25,9741	59/73/103	1478	1478
2-Etil-1-hexanol	26,30	57/41/83	1488	1491
1-Octanol	28,42	56/55/43/70/84	1557	1557
Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy) -	30,42	45/59/73	1623	1619
1-Nonanol	31,47	56/55/41/43/70	1659	1660
3-Nonen-1-ol [Ⓞ]	32,21	55/41/81/95	1684	1682
2-(2-butoxietóxi) -etanol	35,41	45/57/41	1799	1796
1,1'-oxybis-2-Propanol	36,23	45/42/89	1830	1817
Álcool benzílico	37,49	79/108/107/77	1877	1870
Álcool feniletílico	38,49	91/92/122/65	1916	1907
1-Dodecanol	39,77	55/56/42/83	1966	1969
Fenol	40,60	94/66/40	1999	2000
2-Fenoxietanol	44,11	94/77/138	2146	2115

Tabela 4.6 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos acíclicos.

Hidrocarbonetos acíclicos				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
3-Etil-1,5-octadieno [Ⓞ]	11,05	69/41/68	-	1013
3-Etil-1,5-octadieno [Ⓞ]	11,50	69/41/69	-	1013
3-Etil-1,5-octadieno [Ⓞ]	13,25	69/41/70	-	1013
3-Etil-1-Penteno	14,82	41/69	-	1019

β -Ocimene	18,58	93/91/41	-	1252
2,6-dimetil-2,4,6-Octatrieno ^o	22,65	121/105/136/79	1375	1366
2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno ^o	25,06	119/91/134/77	1450	1460
α -Farnesene	34,06	93/41/69	1750	1745

Tabela 4.7 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos cíclicos.

Hidrocarbonetos cíclicos				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
Estireno	18,81	104/78/103	-	1260
Copaene	26,93	161/119/93/41	1508	1492
α -Muurolene	33,74	105/161/204	1739	1726

Tabela 4.8 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química dos ésteres.

Ésteres				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
Éster hexílico do ácido acético	19,29	43/45/56/73	-	1273
Acetato de 2-Hexen-1-ol ^o	21,27	43/67/100	1334	1319
Éster hexílico do ácido butanoico	24,07	43/71/89/56	1419	1414
Éster etílico do ácido octanóico	24,68	45/88/43	1438	1435
Éster 3-hexenil do ácido butanoico	25,50	67/82/71	1463	1455
Éster etílico do ácido benzoico	30,61	105/44/136/51	1630	1612

Tabela 4.9 - Compostos voláteis identificados, pertencentes à classe química das cetonas.

Cetonas				
Nome	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
1-Penten-3-ona	11,26	55/84/41	-	1017
6-metil-5-Hepten-2-ona	21,48	43/41/69	1340	1341
4-hidroxi-4-metil-2-Pentanona	22,39	43/59/101	1368	1351

Tabela 4.10 - Outros compostos voláteis identificados.

Outros				
Nome do composto	Tr (min)	Fragmentos (m/z)	LRI calculado	LRI Literatura
3,7-dimetil-1,3,7-Octatrieno	17,96	42/55/70	-	1255
4,8-Dimetilnona-1,3,7-trieno ^Ø	19,39	69/41/81	-	1302
4,8-Dimetilnona-1,3,7-trieno ^Ø	20,44	69/41/81	1309	1302
[1S-(1 α ,2 α ,3 α β ,4 α ,5 α ,7 α β ,8S*)]-1,2,4-Meteno-1H-indeno, octahidro-1,7a-dimetil-5-(1-metiletil)-	26,70	105/161/204/41	1501	1490
7-Oxabiciclo[4.1.0]2-heptanona	27,37	55/112/83	1523	1700
Dimetil Sulfoxido	29,33	62/78/45	1586	1553
Cariofileno	30,23	41/93/79/133	1617	1595
Butirolactona	30,83	42/41/86	1637	1632
1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	32,78	161/105/79/19	1704	1719
Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 α ,7 β ,8 α)]-	33,48	91/161/79/41/55	729	1730

5-etil-2(5H)-Furanona	34,54	83/55/84/112	1767	1734
Salicilato de metilo	35,09	120/92/152	1788	1765
6,10-dimetil-5,9-Undecadien-2-ona ^o	37,01	43/69/41	1859	1859
1-cloro-Tetradecano,	37,49	79/108/107/77	1894	1888
Dimetil sulfona	37,93	71/43/135	1900	1903
tetrahidro-6-propil-2H-Piran-2-ona	40,25	99/42/71	1985	1976
2,3-dihidro-Benzofurano	49,39	120/91/65	2384	2389

4.2.1. Qualidade do azeite e relação com os compostos voláteis

As vias ou mecanismos pelos quais ocorre a formação dos compostos voláteis, determina qual o papel destes no aroma do azeite. Kalua et al. (2007) referem que compostos cuja formação resulta por ação da via da lipoxigenase estão associados a aromas positivos no azeite e que compostos resultantes de oxidação química ou enzimas exógenas à oliveira, estão associados com defeitos sensoriais no produto final.

O tempo que decorre entre a colheita e o processamento da azeitona, a própria etapa de processamento e o armazenamento dos frutos são fatores que estão relacionados com a qualidade dos azeites, uma vez que a formação dos compostos voláteis pode ocorrer em cada uma destas fases (Kalua et al, 2007). Kalua et al. (2007) analisaram a influência dos compostos voláteis na qualidade do azeite e as mudanças que ocorrem na composição volátil das azeitonas e do azeite durante o processamento e o armazenamento .

Em azeites virgem, os compostos C₆ e C₅ são os que se encontram em maior quantidade. Kalua et al. (2007), refere que na maioria dos azeites virgem europeus (não são especificadas quais as variedades) podem ser encontrados os seguintes compostos voláteis: hexanal, trans-2-hexenal, hexan-1-ol e 3-metilbutano-1-ol.

Reiners & Grosch (1998) analisaram azeites virgem extra de Espanha, Itália e Marrocos relativamente à sua qualidade química e perfil aromático. Concluíram que em todos os azeites estão presentes compostos pertencentes às classes químicas mais abundantes (aldeídos, ésteres), no entanto o que difere e permite distinguir os azeites, é a concentração em que estes compostos se encontram presentes. É ainda referido que, o azeite proveniente de Marrocos continha mais

esteres com características frutadas enquanto o azeite de Espanha abundava em aldeídos C₆ que conferiam odores mais “verdes”.

Os compostos voláteis são importantes na medida em que podem intervir como marcadores da qualidade do azeite, tanto pelos atributos positivos como pelos defeitos que podem demarcar.

O azeite pode sofrer processos de oxidação devido às condições de processamento e armazenamento, mas também pode ser influenciada por questões intrínsecas ao azeite, relacionadas com a sua composição química. Existem componentes minoritários no azeite (por exemplo compostos fenólicos) que influenciam a estabilidade oxidativa do azeite e que podem atuar como antioxidantes (Kalua et al. 2007).

Compostos como o pentanal, hexanal, octanal, nonanal, 2,4-heptadienal, 2-pentilfurano, 2-etilfurano, formam-se em grande quantidade durante o processo de oxidação do azeite e são considerados marcadores de oxidação do azeite, com exceção do hexanal (Kalua et al. 2007) (Custódio, 2009).

Os compostos octanal, nonanal, 2,4-Heptadienal foram identificados nos azeites em estudo. Em média, os valores de área em percentagem destes compostos foram superiores nos azeites de produção biológica (Tabela 4.11). Relativamente a diferenças entre variedades, a Galega foi a variedade em que o valor médio da área em percentagem foi superior.

Tabela 4.11 - Compostos voláteis "marcadores" de oxidação.

Composto	MPB	MPI
Octanal	0,068 ± 0,026	0,064 ± 0,030
Nonanal	0,230 ± 0,348	0,135 ± 0,212
2,4-Heptadienal	0,011 ± 0,004	0,004 ± 0,004

Verificou-se neste trabalho e encontra-se também referido na literatura (Jalali-Heravi & Parastar, 2010) que, durante o processo de separação dos compostos que ocorre na coluna cromatográfica, poderão ocorrer co-éluição de compostos, o que dificulta a identificação dos mesmos. Neste caso, os compostos 2-Penten-1-ol, Hex-3-en-1-ol, 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene e ácido acético surgiram co-eluídos (Figura 4.2) e através da ferramenta de

desconvulsão do GC, foi possível perceber que no mesmo pico cromatográfico, estavam compreendidos mais do que um composto.

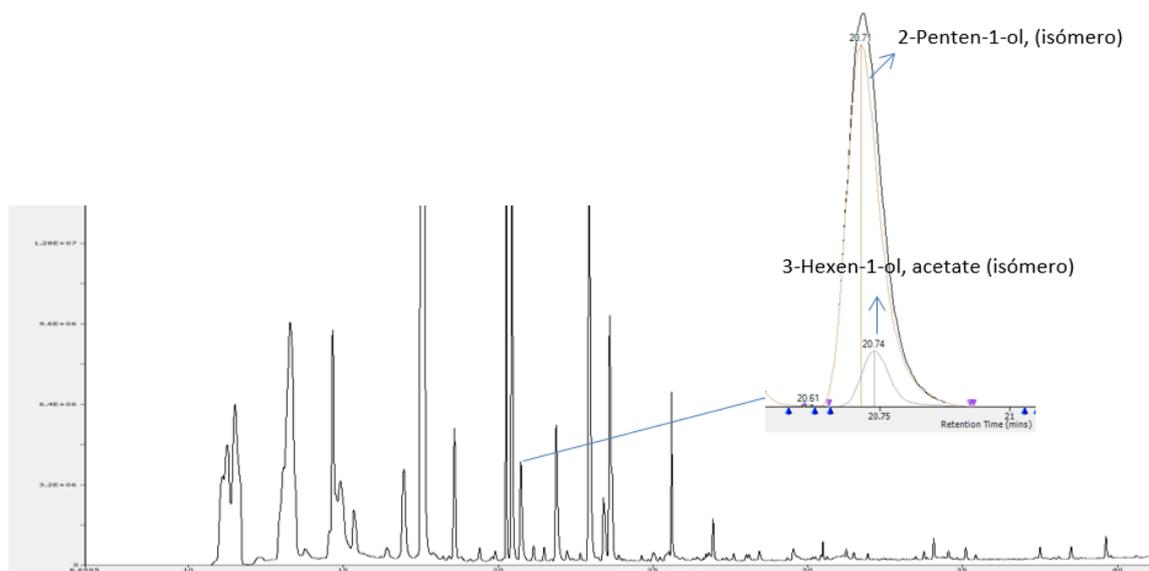


Figura 4.2 - Cromatograma da amostra de azeite de Galega (C) obtido por HS-SPME – GC-ToF/MS, referente à co-eluição do composto acetato de 3-Hexen-1-ol (isómero) com o 2-Penten-1-ol (isómero).

É importante referir este aspeto, e certificarmo-nos da sua ocorrência uma vez que estes compostos poderiam ser diferenciadores do modo de produção e a sua co-eluição dificultaria a sua deteção e, posterior, identificação.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espetros de massa obtidos com os espetros de massa de compostos de referência, informação esta, disponível na biblioteca espectral de massa NIST. Adicionalmente, teve-se em consideração a estrutura, o peso molecular de cada composto e foram comparados os tempos de retenção para cada composto de referência analisado com os tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos - mistura de alcanos (C_{13} - C_{29}), que permitiu posteriormente o cálculo dos índices de retenção linear (LRI). Estes valores de LRI foram comparados com os valores já mencionados na literatura, tendo em conta o tipo de coluna utilizada, neste caso, uma coluna polar. Os índices de retenção da literatura relativamente a cada composto foram obtidos a partir da biblioteca NIST.

A existência de isómeros para alguns dos compostos, leva a que à repetição das designações dos compostos nas tabelas apresentadas neste trabalho. No entanto, não é possível saber qual o isómero a que refere, uma vez que a confirmação teria que ser realizada com recurso a padrões comerciais.

De acordo com Martins et al. (2020), a quantidade de compostos voláteis e mesmo o tipo de classes químicas presentes nos azeites depende de fatores como a cultivar, o tipo de técnicas envolvidas na produção, características edafoclimáticas e até com o processo de extração do azeite.

4.3. Análise da fracção volátil

Os compostos detetados e identificados foram agrupados de acordo com a sua classe química, tal como referido anteriormente. De modo a caracterizar as fracções voláteis de cada amostra de azeite, na Tabela 4.12, encontram-se os valores do total das áreas relativas, para cada classe química. Desta forma é possível perceber o peso que cada classe química tem na fracção volátil de azeites de diferente variedade e modo de produção.

Tabela 4.12 - Percentagem de área relativa das diferentes classes químicas de compostos identificados. 4.12

Azeite	Aldeídos	Álcoois	Hidrocarbonetos acíclicos	Hidrocarbonetos cíclicos	Ésteres	Cetonas	Outros
<u>D*</u>	66,8	21,6	4,8	0,5	0,1	0,2	5,9
<u>C*</u>	66,9	16,1	9,7	0,5	0,2	0,5	6,1
<u>K*</u>	47,5	34,4	7,3	0,0	0,1	1,6	9,1
<u>J*</u>	57,4	23,7	11,0	0,0	0,2	0,3	7,3
<u>F*</u>	72,8	21,3	1,9	0,0	1,6	0,5	1,9
B	65,2	18,9	10,4	1,5	0,1	0,2	3,7
A	59,5	31,1	4,0	0,3	0,1	0,3	4,7
I	53,8	33,2	8,4	0,0	0,1	0,5	4,0
H	35,7	45,1	8,8	0,0	0,3	0,3	9,8
G	65,1	25,7	3,9	0,0	0,2	0,5	4,5
E	63,5	29,4	0,7	0,0	3,9	0,3	2,1

A fração volátil dos azeites em modo de produção biológica é constituída por aldeídos (47,5% a 72,8%), álcoois (16,1% a 34,4%), hidrocarbonetos acíclicos (1,9% a 11,0%) e cíclicos (0,0% a 0,5%), ésteres (0,1% a 1,6%), cetonas (0,2% a 1,6%) e outros compostos (1,9% a 9,1%).

No caso dos azeites em modo de produção integrada, a composição da fração volátil está distribuída da seguinte forma: aldeídos (35,7% a 65,2%), álcoois (18,9% a 45,1%), hidrocarbonetos acíclicos (3,9% a 10,4%) e cíclicos (0,0% a 1,5%), ésteres (0,1% a 0,3%), cetonas (0,2% a 0,5%) e outros compostos (2,1% a 9,8%).

Independentemente do modo de produção, as classes químicas que predominam em todas as amostras de azeite são os aldeídos, os álcoois e os hidrocarbonetos acíclicos. Estes compostos, entre outros (ésteres, cetonas e furanos) são descritos como os que conferem o aroma característico do azeite (Peres et al., 2013).

Realizou-se uma análise preliminar dos resultados, sem a aplicação de tratamento estatístico.

Os dados obtidos relativamente a cada classe química foram representados através de *Polar Heatmaps*, que permitem identificar quais os compostos que se manifestam com maior intensidade, em termos de percentual de área relativa.

4.3.1. Aldeídos

Nos azeites analisados foram detetados e identificados 15 compostos pertencentes à classe química dos aldeídos (Figura 4.3).

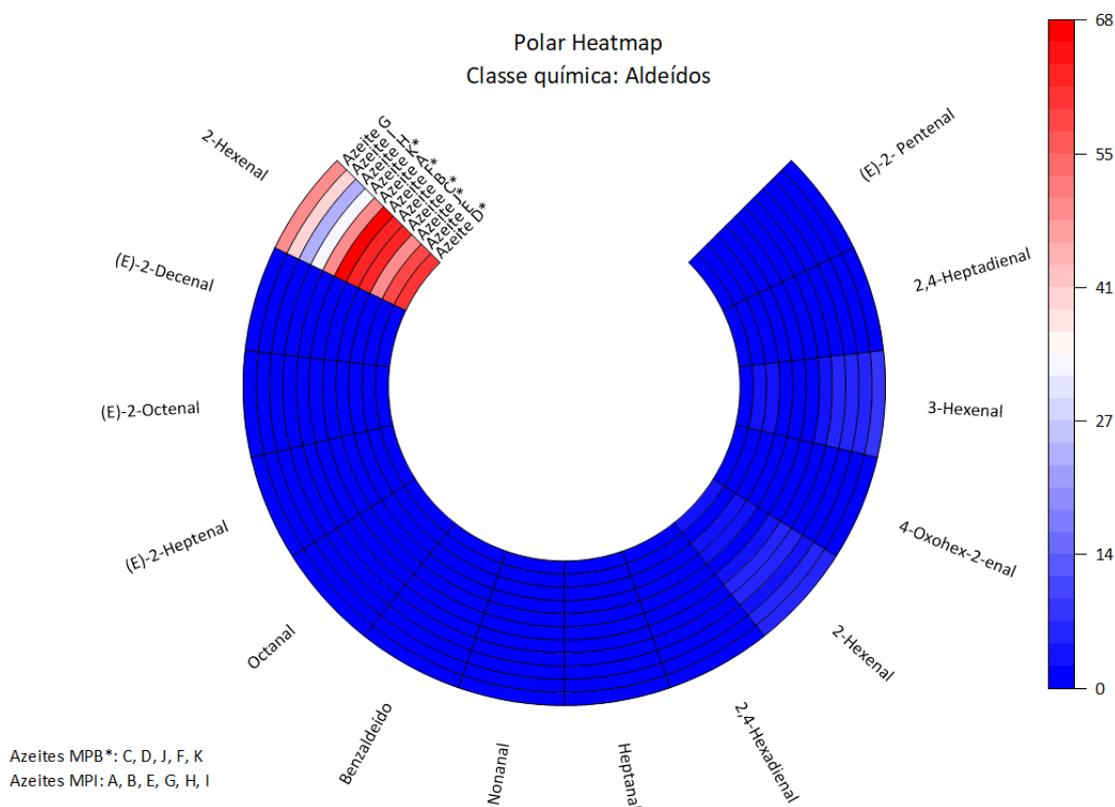


Figura 4.3 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos aldeídos.

O composto que se destaca nesta classe é o 2-Hexenal (isómero) com um tempo de retenção correspondente a 17, 53 minutos. O valor percentual da área para este composto varia entre os 32,11% (Azeite K) e os 68,14% (Azeite F), valores significativamente mais elevados comparativamente aos restantes compostos nesta classe. Existe uma grande variação na escala de valores, o que não permite intercepar possíveis diferenças em compostos com valores mais baixos de percentual da área.

Apesar de não se saber com certeza a que isómero corresponde este composto, o (E)-2-Hexenal é referenciado algumas vezes como o composto detetado em maior quantidade. Num estudo realizado com quatro variedades de oliveira (*Oblica*, *Lastovka*, *Levantinka* e *Krvavica*) para a avaliação dos compostos voláteis e características sensoriais dos azeites virgem, o (E)-2-Hexenal é o composto detetado em maior quantidade em três das variedades. Na variedade *Oblica*, o composto apresentou valores de 54,86%, na *Lastovka* 55,27% e na variedade *Levantinka*, o valor mais elevado de 75,89% (Žanetić et al., 2021).

Peres et al. (2013), também referem que na caracterização dos compostos voláteis em azeites virgem extra de Galega Vulgar e Cobrançosa, o composto mais abundante foi o *trans*-2-hexenal, com valores entre 2.3 a 7.0 mg/kg para a Galega e 1.9 a 3.3 mg/kg, na Cobrançosa.

Não é possível afirmar que o 2-Hexenal identificado neste trabalho, corresponde a alguma das formas isoméricas mencionadas. No entanto, os valores referenciados por Žanetić et al. (2021), sugerem que talvez se possa tratar do (E)-2-Hexenal.

Na Figura 4.4, estão representados os restantes aldeídos identificados nas amostras de azeite, de onde foi excluído o 2-Hexenal, para facilitar a análise.

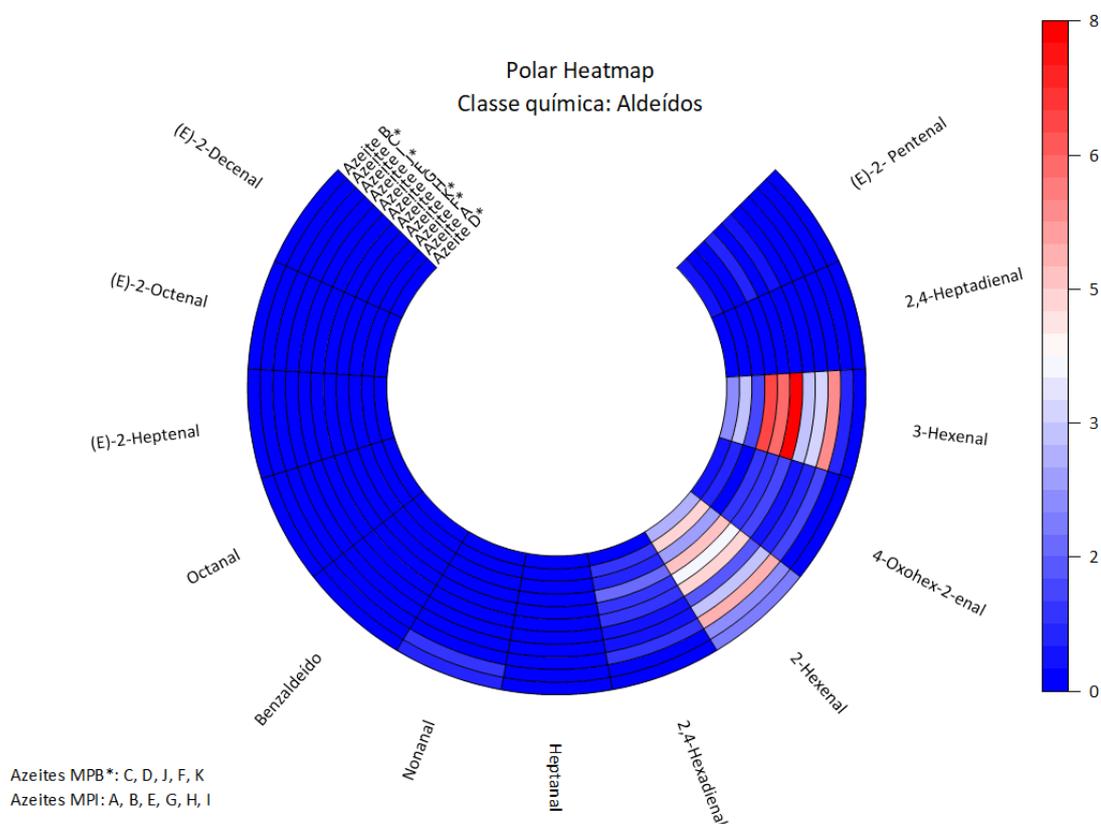


Figura 4.4 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos aldeídos, excluindo o isómero do 2-Hexenal com maior intensidade.

O 3-Hexenal e o outro isómero do 2-Hexenal identificado, apresentam uma intensidade mais elevada que os restantes compostos. O 3-Hexenal é mais intenso nos azeites K* (6,68%), H (6,27%), I (5,65%) e G (7,85%), todos pertencentes à variedade Cobrançosa.

Tal como o 2-Hexenal, o 3-Hexenal é outro dos aldeídos C₆, descrito como um dos compostos mais comuns nos azeites virgem extra (Žanetić et al., 2021).

Destes compostos, que se destacaram mais, não parece existir nenhuma relação entre os modos de produção. O 2-Hexenal foi identificado por Ninfali et al. (2013) num estudo de 3 anos em que avaliaram a qualidade de azeites virgem extra orgânicos e convencionais das variedades *Leccino* e *Frantoio*. No entanto, estes autores não verificaram diferenças significativas no teor deste composto para os diferentes modos de produção.

4.3.2. Álcoois

A classe química dos álcoois, é também uma das classes predominantes, com mais compostos identificados. No total foram identificados 22 álcoois representados na Figura 4.5.

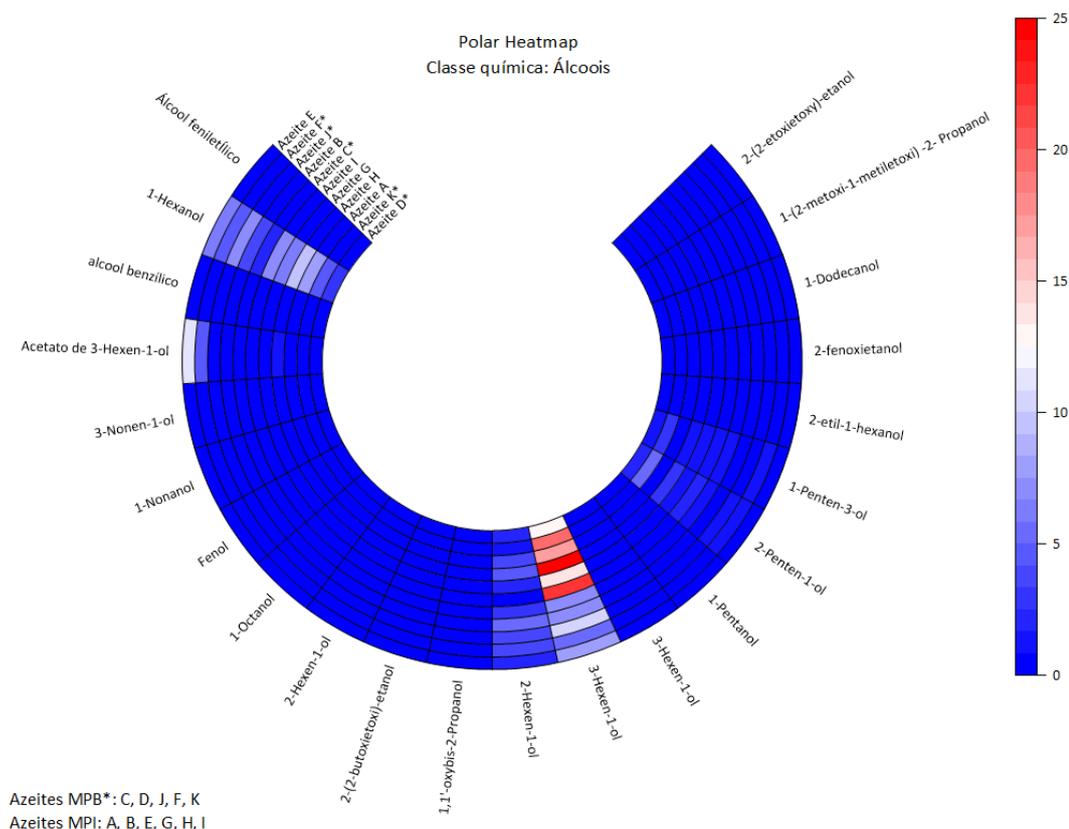


Figura 4.5 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos álcoois.

Destacam-se os compostos 3-Hexen-1-ol, 1-Hexanol e acetato de 3-Hexen-1-ol.

O 3-Hexen-1-ol aparece com mais intensidade nos azeites K* (19,21%), A (16,44%), H (24,49%) e I (22,03%), pertencentes às variedades Galega e Cobrançosa. Este composto forma-se pela redução do aldeído 3-Hexenal por intermédio da enzima álcool desidrogenase (Malheiro et al., 2017).

O acetato de 3-Hexen-1-ol foi identificado com mais intensidade apenas nos azeites Arbequina e é possível identificar uma diferença entre o azeite F* e o azeite E, em a percentagem de área relativa é de 4,50% e 6,45%.

Olmo-Cunillera et al. (2022), identificaram o acetato de 3-Hexen-1-ol e o 1-Hexanol, quando analisaram a variação do perfil volátil de azeites virgem extra de Arbequina, com diferentes condições na etapa de malaxação. A concentração destes e outros compostos C₆ varia significativamente com a duração do processo de malaxação e a temperatura a que este ocorre.

4.3.3. Hidrocarbonetos acíclicos e cíclicos

Foram identificados oito compostos pertencentes à classe dos hidrocarbonetos acíclicos.

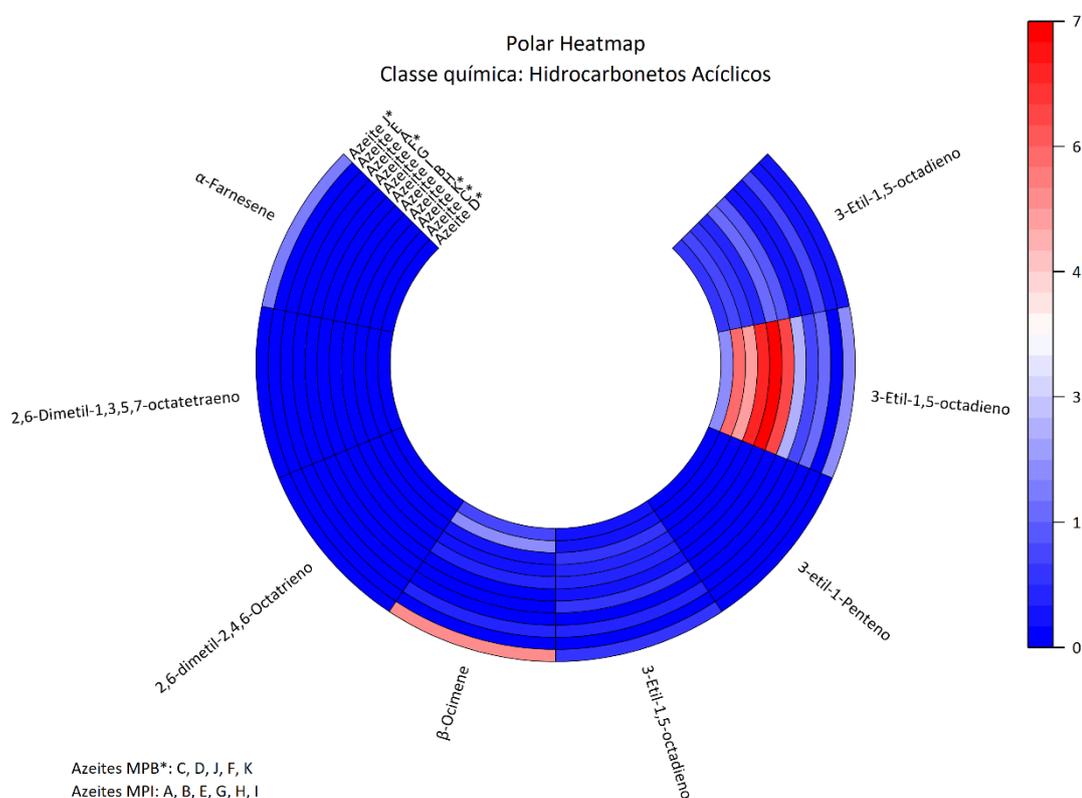


Figura 4.6 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos acíclicos.

Nos hidrocarbonetos acíclicos, foram identificados três isómeros de 3-Etil-1,5-octadieno, mas apenas um (tr= 13,25 min.) apresenta diferenças significativas. Os azeites que estão representados com maior intensidade são: azeite H (6,90%), B (7,42), I (6,341), C* (5,88%) e K* (5,15%).

O composto β -Ocimene está representado com maior intensidade em três azeites, todos de produção biológica. O valor mais elevado pertence ao azeite J* da variedade Cobrançosa – 5,44%. No entanto, não se verifica nenhuma diferença nos restantes azeites da variedade

Nos hidrocarbonetos cíclicos (Figura 4.7), destaca-se o Copaeno, cujos resultados demonstram que surge com mais intensidade nos azeites B, A, C* e D*, todos pertencentes à variedade Galega.

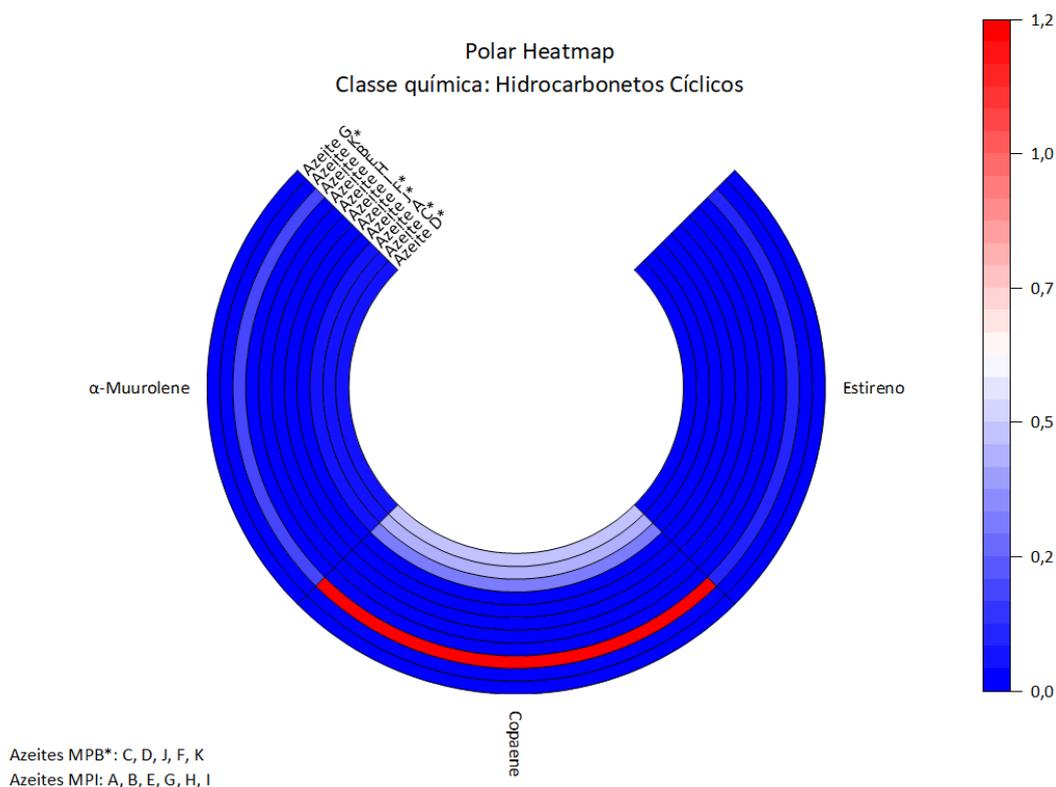


Figura 4.7 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos hidrocarbonetos cíclicos.

No entanto, não foi encontrada literatura que estabelecesse uma ligação entre este composto e a variedade Galega.

Relativamente aos modos de produção, os resultados não indicam que hidrocarbonetos acíclicos e cíclicos possam ser diferenciadores. No entanto, estes compostos podem ser uma ferramenta na rastreabilidade geográfica dos azeites. Zunin et al. (2005), analisaram hidrocarbonetos terpenóides, como α -copaeno, α -muurolene, α -fernese, β -Ocimene, de 105 amostras de azeite virgem extra da zona do Mediterrâneo (30 de Ligúria, 30 de Puglia, 15 da Grécia, 15 de Espanha e 15 da Tunísia). As variedades de oliveira não estão identificadas. A identificação foi realizada por GC-MS. O teor do composto trans- β -Ocimene foi baixo nos azeites de Puglia, Grécia

e Espanha, em contraste com os azeites de Ligúria, onde o teor é elevado. A distribuição do teor de α -Copaeno e de α -Murolene é muito similar, embora em quantidades diferentes, já que se verifica mais elevado nos azeites italianos, pelo que este composto pode ser um diferenciador geográfico destes azeites.

4.3.4. Ésteres

Foram identificados nove compostos pertencentes à classe química dos ésteres (Figura 4.8) Apesar de ser a terceira classe química com mais compostos identificados, o seu teor corresponde a uma fração minoritária na composição da fração volátil dos azeites estudados.

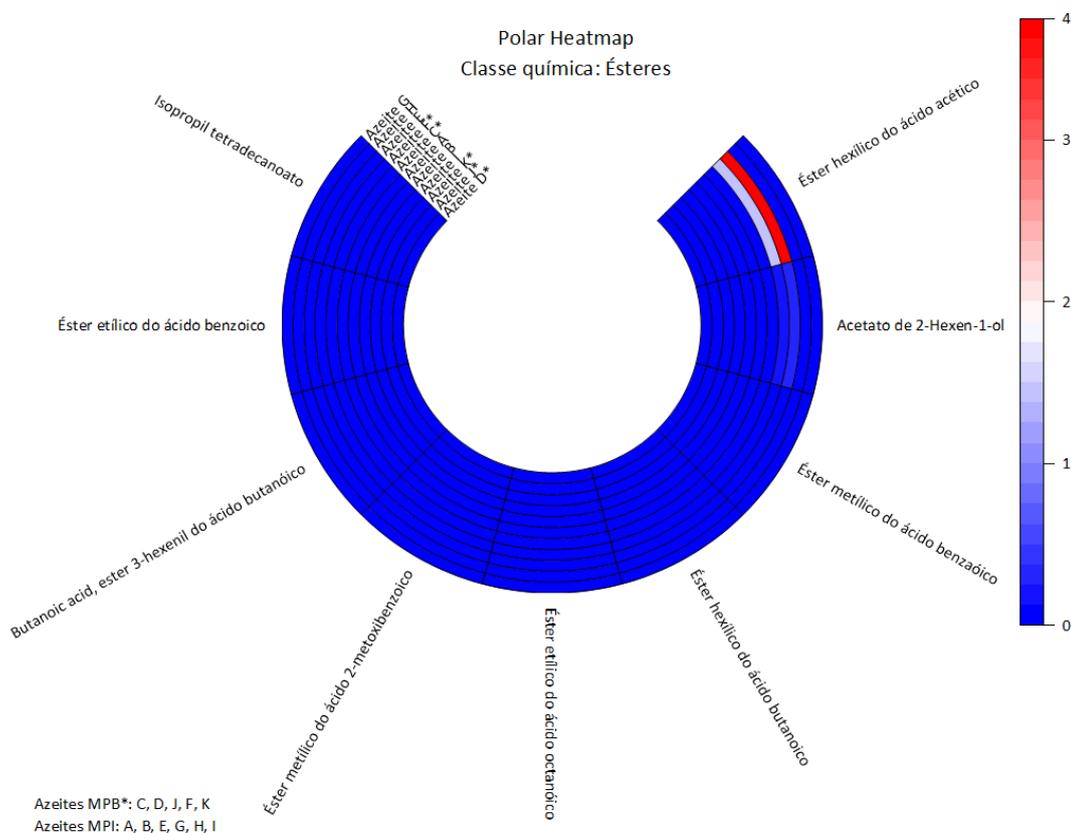


Figura 4.8 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química dos ésteres.

O éster hexílico do ácido acético é o composto com maior intensidade, mas esta diferença na intensidade apenas ocorreu em dois azeites, no E e no F*, ambos de Arbequina. A percentagem de área relativa deste composto é superior no azeite E (MPI) do que no azeite F* (MPB).

4.3.5. Cetonas

Na Figura 4.9 estão identificados os três compostos identificados na classe química das cetonas.

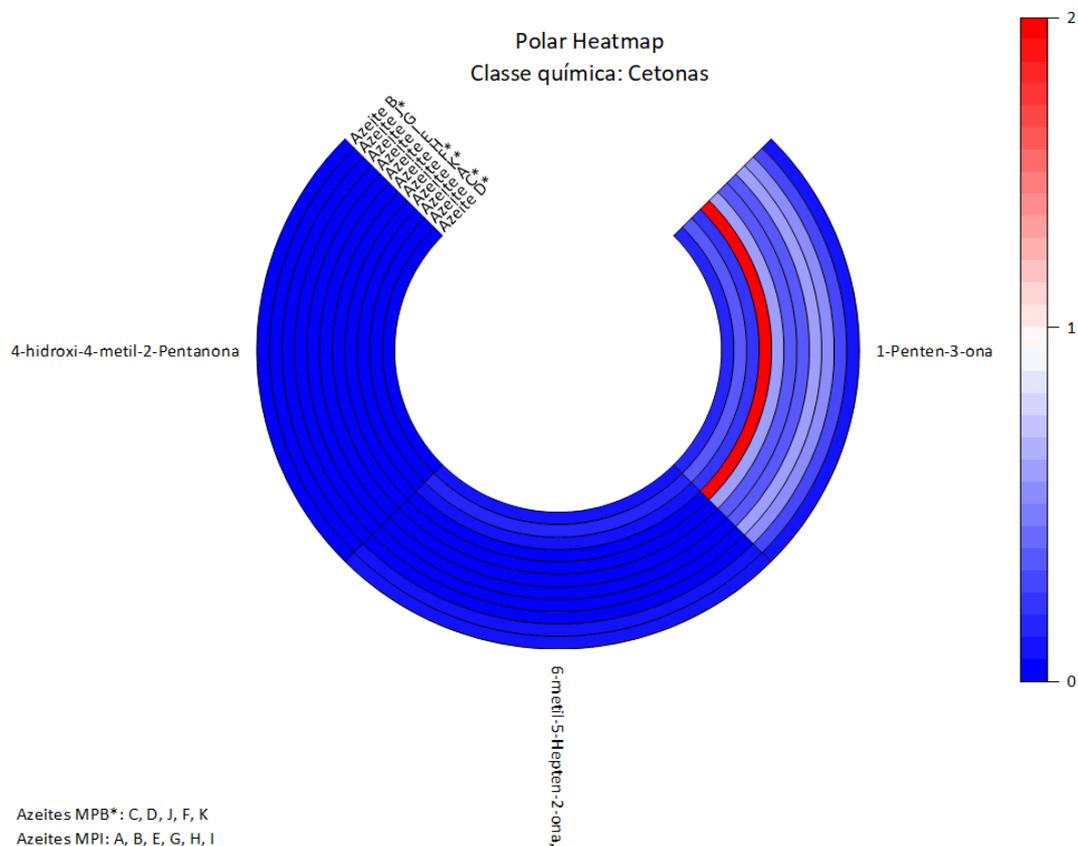


Figura 4.9 - Representação da intensidade de cada composto volátil identificado nas amostras de azeite, pertencentes à classe química das cetonas.

O composto 1-Penten-3-ona é o único que apresenta diferenças visíveis. Este composto tem intensidade máxima no azeite K* da variedade Cobrançosa. No entanto, não existe uma tendência que se possa apontar para diferenciar azeites de modo de produção distintos.

4.4. Análise estatística

As análises de variância realizadas revelaram diferenças entre algumas variáveis. Os resultados foram compilados na Tabela 4.13, onde se encontra referido o número de amostras utilizado na realização das análises de variância. Diferentes letras na linha significam diferenças significativas, ou seja, $p < 0,05$, entre modos de produção, para cada variedade.

A última coluna da tabela reflete diferenças significativas entre variedades, independentemente do modo de produção.

Neste estudo, os compostos 4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene, 1-Nonanol, α -Farnesene e Álcool feniletílico apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) nos azeites Galega MPB vs. Galega MPI, Cobrançosa MPB vs. Cobrançosa MPI e Arbequina MPB vs. Arbequina MPI.

Apenas a título de curiosidade, o composto 4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene, é um terpeno acíclico, que é emitido por diversas plantas como resposta a ataques de herbívoros e tem sido também descrito como um atrativo para diversas espécies de insectos (Pherobank, 2023). Relativamente ao composto α -farnesene é considerado uma feromona sexual da mosca da fruta do mediterrâneo.

Jurado-Campos et al. (2021), realizaram uma tentativa de autenticar azeites biológicos dos convencionais, através da identificação dos compostos voláteis. No total, identificaram 12 compostos, entre os quais, o *3-hexenyl acetate*, que por análise estatística, concluíram ser o único composto que poderia ser diferenciador dos azeites biológicos e convencionais. Este composto foi também identificado no estudo desenvolvido neste trabalho, mas por aplicação de tratamento estatístico verificou-se que não apresenta diferenças significativas nos azeites em análise.

O composto 2-Hexenal, com percentagem de área relativa mais elevada (Figura 4.3), ao contrário do que é visível nos *Heatmaps*, apenas apresenta diferenças significativas nos azeites de Arbequina, nomeadamente entre modos de produção.

Ao contrário do que se verificou na análise preliminar com recurso aos *Heatmaps*, o 3-Hexenal, e o 3-Hexen-1-ol apresentaram diferenças significativas, ou seja, $p \leq 0,05$ nos azeites de Arbequina, para os dois modos de produção

Os resultados para o 3-Hexen-1-ol acetato e para o éster hexílico do ácido acético foram idênticos, ou seja, tanto na análise preliminar como no tratamento estatístico, estes compostos apresentam diferenças significativas entre o azeite biológico de Arbequina e o azeite de produção integrada de Arbequina.

Na análise preliminar, o copaeno apresentou diferenças na variedade Galega. No entanto, os resultados da análise estatística demonstram que existem diferenças significativas entre os modos de produção, mas para os azeites da variedade Cobrançosa.

Tabela 4.13 - Resultado da análise de variâncias (ANOVA), com teste de comparação de médias ($\alpha=0,05$), tendo como variável independente o modo de produção 1-Biológico, 2-Integrado.

Composto	Galega MPB (n=6)	Galega MPI (n=6)	Cobrançosa MPB (n=6)	Cobrançosa MPI (n=9)	Arbequina MPB (n=3)	Arbequina MPI (n=3)	Diferenças entre variedades
X ₁ :3-Ethyl-1,5-octadiene	0,93±0,16	1,34±0,39	0,72±0,24	0,80 ±0,44	0,47 ±0,16	0,35±0,03	G≠C≠A
X ₂ : 1-Penten-3-one	0,20±0,16	0,11±0,11	0,89±0,89	0,42±0,21	0,52±0,35	0,27±0,15	(G≠C)=A
X ₃ :3-Ethyl-1,5-octadiene	0,42±0,22	0,61±0,38	0,88±0,53	0,59±0,25	0,24±0,06 ^e	0,06±0,02 ^f	(C≠A)=G
X ₄ :3-Ethyl-1,5-octadiene	4,05±2,33	4,52±2,93	3,69±3,48	5,30±2,56	1,09±0,74	0,13±0,02	(G=C)≠A
X ₅ :2-Pentenal, (E)-	0,28±0,08 ^a	0,12±0,05 ^b	0,46±0,32	0,27±0,11	0,26±0,11	0,22±0,02	G=C=A
X ₇ :3-Hexenal	1,40±0,77	1,48±2,02	4,97±1,85	6,59±1,90	1,08±0,04 ^e	2,92±0,15 ^f	(G=A)≠C
X ₈ :1-Penten-3-ol	1,08±0,15 ^a	0,55±0,14 ^b	1,65±1,05	0,98±0,09	1,56±0,02 ^e	0,51±0,03 ^f	G=C=A
X ₁₀ :Heptanal	0,12±0,09	0,13±0,06	0,01±0,00	0,01±0,00	0,03±0,03	0,05±0,04	(C=A)≠G
X ₁₁ :2-Hexenal	2,48±0,17	3,36±1,72	3,86±1,00	4,55±0,52	2,37±0,02	1,41±0,84	(G=A)≠C

X ₁₂ :2-Hexenal	61,27±1,13	55,60±14,67	40,96±9,08	37,85±11,00	68,14±1,22 ^e	57,97±0,56 ^f	(G=A)≠C
X ₁₄ :1-Pentanol	0,06±0,03 ^a	0,03±0,01 ^b	0,13±0,08	0,14±0,09	0,05±0,00 ^e	0,02±0,00 ^f	(G=A)≠C
X ₁₅ :β-Ocimene	1,62±0,48 ^a	0,63±0,15 ^b	2,87±2,58 ^c	0,27±0,13 ^d	0,05±0,03	0,05±0,00	G=C=A
X ₁₆ :Styrene	0,00±0,00	0,06±0,05	0,01±0,00	0,01±0,00	n.d.	n.d.	G=C
X ₁₇ :Acetic acid, hexyl ester	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,35±0,02 ^e	3,54±0,13 ^f	-
X ₁₈ :4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene	0,18±0,02 ^a	0,06±0,02 ^b	0,18±0,02 ^c	0,09±0,09 ^d	n.d.	n.d.	G=C
X ₁₉ :Octanal	0,09±0,02	0,09±0,05	0,06±0,02	0,05±0,01	0,05±0,00	0,06±0,05	G≠(C=A)
X ₂₀ :4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene	4,77±0,27 ^a	1,94±0,52 ^b	5,51±0,63 ^c	2,70±2,23 ^d	0,61±0,04 ^e	0,21±0,01 ^f	(G=C)≠A
X ₂₁ :2-Penten-1-ol	1,65±0,40 ^a	0,67±0,16 ^b	3,37±2,30	2,12±0,57	1,52±0,03 ^e	0,71±0,02 ^f	(G=A)≠C

X ₂₂ :3-Hexen-1-ol, acetate	0,25±0,08 ^a	0,49±0,16 ^b	0,43±0,11	0,79±0,56	4,65±0,10 ^e	11,17±0,57 ^f	(G=C)≠A
X ₂₃ :2E-Heptenal	0,15±0,05 ^a	0,09±0,03 ^b	0,12±0,06	0,11±0,06	0,08±0,00 ^e	0,03±0,01 ^f	(G=C)≠A
X ₂₄ :2-Hexen-1-ol, acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,19±0,00 ^e	0,27±0,01 ^f	-
X ₂₅ :5-Hepten-2-one, 6-methyl-	0,13±0,03	0,09±0,02	0,06±0,01 ^c	0,02±0,01 ^d	0,02±0,00	0,02±0,00	G≠(C=A)
X ₂₆ :1-Hexanol	2,46±0,15 ^a	5,96±2,88 ^b	5,87±1,44	7,31±1,50	4,29±0,08 ^e	6,45±0,05 ^f	(G≠C)=A
X ₂₇ :3-Hexen-1-ol	0,20±0,06	0,18±0,08	0,24±0,01	0,24±0,10	0,09±0,00 ^e	0,07±0,00 ^f	(G=C)≠A
X ₂₈ :2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	0,02±0,01	0,04±0,01	0,03±0,02	0,03±0,01	0,01±0,00 ^e	0,01±0,00 ^f	(G=C)≠A
X ₂₉ :2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-	0,05±0,02 ^a	0,02±0,01 ^b	0,14±0,00 ^c	0,01±0,00 ^d	n.d.	n.d.	-
X ₃₀ :2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	0,01±0,00	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00 ^e	0,00±0,00 ^f	(G=A)≠C
X ₃₁ :3-Hexen-1-ol	9,83±2,53	11,74±6,19	14,53±4,70	19,94±4,81	5,07±0,09 ^e	7,95±0,03 ^f	(G=A)≠C

X ₃₂ :Nonanal	0,53±0,39	0,40±0,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
X ₃₃ :2,4-Hexadienal	0,10±0,01	0,53±0,45	1,04±0,74	0,94±0,08	0,64±0,02	0,37±0,15	(G=A)≠C
X ₃₄ :2-Hexen-1-ol	2,78±0,56	4,26±1,39	2,29±1,40	2,33±1,56	3,57±0,06 ^e	1,95±0,05 ^f	(G≠C)=A
X ₃₅ :2-Hexen-1-ol	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00 ^e	0,01±0,00 ^f	G≠(C=A)
X ₃₆ :Butanoic acid, hexyl ester	0,01±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01 ^c	0,01±0,00 ^d	n.d.	n.d.	-
X ₃₇ :2-Octenal E	0,04±0,02	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	n.d.	n.d.	G≠C
X ₃₉ :2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene	0,03±0,01 ^a	0,01±0,00 ^b	0,06±0,05	0,00±0,00	n.d.	n.d.	G=C
X ₄₀ :Acetic acid	0,06±0,01 ^a	0,52±0,34 ^b	0,49±0,43	0,87±0,65	0,47±0,33	0,68±0,03	(G≠C)=A
X ₄₁ :Butanoic acid, 3-hexenyl ester	0,04±0,02 ^a	0,01±0,00 ^b	0,11±0,01 ^c	0,01±0,00 ^d	n.d.	n.d.	G=C
X ₄₂ :2-Propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,01	0,02±0,01	n.d.	n.d.	G=C

X ₄₃ :1-Hexanol, 2-ethyl-	0,02±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,02	n.d.	n.d.	-
X ₄₄ :2,4 Heptadienal	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,01	0,01±0,00	n.d.	n.d.	-
X ₄₅ :1,2,4-Metheno-1H-indene, octahydro-1,7a-dimethyl-5-(1-methylethyl)-, [1S-(1α,2α,3aβ,4α,5α,7aβ,8S*)]-	0,03±0,00	0,07±0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
X ₄₆ :Copaene	0,44±0,04	0,75±0,48	0,03±0,01 ^c	0,01±0,00 ^d	0,03±0,01	0,03±0,00	G≠(C=A)
X ₄₇ :7-Oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one	0,04±0,01	0,02±0,02	0,08±0,03	0,10±0,02	0,03±0,00 ^e	0,04±0,00 ^f	(G=A)≠C
X ₄₈ :Benzaldehyde	0,07±0,00 ^a	0,05±0,01 ^b	0,03±0,01	0,02±0,00	0,04±0,00 ^e	0,04±0,00 ^f	G≠C≠A
X ₄₉ :1-Octanol	0,11±0,02	0,16±0,06	0,06±0,02	0,05±0,02	0,07±0,01 ^e	0,03±0,01 ^f	G≠(C=A)
X ₅₀ :Dimethyl Sulfoxide	0,02±0,01	0,03±0,01	0,09±0,04	0,13±0,05	0,06±0,01 ^e	0,13±0,02 ^f	G≠(C=A)

X ₅₁ :4-Oxohex-2-enal	0,25±0,09	0,40±0,39	0,82±0,26	1,08±0,24	0,11±0,01 ^e	0,40±0,06 ^f	(G=A)≠C
X ₅₂ :Caryophyllene	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,04±0,04	0,01±0,00	n.d.	n.d.	G=C
X ₅₃ :Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	0,06±0,03	0,12±0,24	0,06±0,02	0,10±0,08	0,04±0,01 ^e	0,01±0,00 ^f	G=C=A
X ₅₄ :Benzoic acid, methyl ester	0,03±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,03±0,02	0,04±0,02	0,05±0,00 ^e	0,10±0,01 ^f	G≠C≠A
X ₅₅ :Butyrolactone	0,01±0,00	0,01±0,00	n.d.	n.d.	0,00±0,00 ^e	0,01±0,00 ^f	-
X ₅₆ :2-Decenal, E	0,05±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,01±0,00	0,02±0,02	G≠(C=A)
X ₅₇ :1-Nonanol	0,08±0,00 ^a	0,14±0,04 ^b	0,03±0,01 ^c	0,02±0,00 ^d	0,03±0,00 ^e	0,02±0,00 ^f	G≠(C=A)
X ₅₉ :3-Nonen-1-ol	0,01±0,00	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	n.d.	n.d.	-
X ₆₁ :Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1α,7β,8αα)]-	0,02±0,00	0,04±0,03	0,03±0,01 ^c	0,00±0,00 ^d	n.d.	n.d.	G=C

X ₆₂ : α -Muurolene	0,07 \pm 0,00	0,11 \pm 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
X ₆₃ :desconhecido	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00 ^e	0,02 \pm 0,00 ^f	(G=A) \neq C
X ₆₄ : α -Farnesene	0,17 \pm 0,03 ^a	0,08 \pm 0,03 ^b	0,88 \pm 0,96 ^c	0,04 \pm 0,01 ^d	0,04 \pm 0,01 ^e	0,10 \pm 0,02 ^f	G=C=A
X ₆₅ :2(5H)-Furanone, 5-ethyl-	0,13 \pm 0,04	0,16 \pm 0,14	0,28 \pm 0,05 ^c	0,39 \pm 0,09 ^d	0,11 \pm 0,00 ^e	0,18 \pm 0,01 ^f	(G=A) \neq C
X ₆₆ :Methyl salicylate	0,19 \pm 0,04 ^a	0,33 \pm 0,11 ^b	0,12 \pm 0,08	0,16 \pm 0,05	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	G \neq C \neq A
X ₆₇ :Ethanol, 2-(2- butoxyethoxy)-	0,05 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,04 ^b	0,07 \pm 0,04	0,11 \pm 0,06	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	G=(C \neq A)
X ₆₈ :2-Propanol, 1,1'- oxybis-	n.d.	n.d.	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	n.d.	n.d.	-
X ₆₉ :5,9-Undecadien- 2-one, 6,10-dimethyl-	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,05	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	(G=A) \neq C
X ₇₀ :Benzyl alcohol	0,11 \pm 0,03	0,12 \pm 0,03	0,05 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00 ^e	0,15 \pm 0,01 ^f	(G=A) \neq C

X71:Tetradecane, 1-chloro-	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,04±0,04	0,02±0,01	n.d.	n.d.	-
X72:Dimethyl sulfone	0,03±0,01 ^a	0,01±0,00 ^b	0,19±0,04 ^c	0,02±0,01 ^d	0,04±0,01	0,04±0,01	G=C=A
X73:Phenylethyl Alcohol	0,11±0,04 ^a	0,29±0,12 ^b	0,13±0,02 ^c	0,36±0,17 ^d	0,12±0,01 ^e	0,35±0,04 ^f	G=C=A
X74:desconhecido	0,37±0,10	0,61±0,58	0,92±0,25 ^c	1,35±0,36 ^d	0,33±0,01 ^e	0,59±0,07 ^f	(G=A)≠C
X75:1-Dodecanol	0,02±0,01	0,03±0,02	0,02±0,01	0,04±0,03	n.d.	n.d.	-
X77:Phenol	0,01±0,00	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00 ^e	0,01±0,00 ^f	G≠(C=A)
X78:Isopropyl myristate	0,02±0,01 ^a	0,06±0,02 ^b	0,02±0,00	0,06±0,04	0,02±0,00	0,01±0,00	G=C=A
X79:Triacetin	n.d.	n.d.	0,02±0,01	0,02±0,01	n.d.	n.d.	-
X80:Benzoic acid, 2-methoxy-, methyl ester	0,01±0,00	0,02±0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
X81:Ethanol, 2-phenoxy-	0,01±0,00 ^a	0,02±0,01 ^b	0,03±0,01	0,02±0,02	n.d.	n.d.	-

X ₈₂ :Benzofuran, 2,3-dihydro-	0,01±0,00 ^a	0,02±0,01 ^b	0,01±0,00	0,01±0,00	n.d.	n.d.	-
X ₈₃ :desconhecido	0,16±0,06	0,30±0,16	0,17±0,05	0,21±0,06	0,14±0,00 ^e	0,18±0,01 ^f	G=C=A

Ninfali et al. (2007), avaliaram durante 3 anos, a qualidade e os compostos voláteis de azeites virgem extra das variedades *Leccino* e *Frantoio* obtidos de sistema de produção orgânico e convencional. Utilizaram o mesmo método de separação e identificação (SPME-GC-MS) utilizado neste trabalho. Identificaram alguns dos compostos que também foram identificados neste trabalho (Hexanal, 2-Pental, 2-Hexenal, 3-Hexen-1-ol), no entanto, não destacam nenhum composto em particular que pudesse ser diferenciador do modo de produção. É referido que o teor ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) destes compostos difere ocasionalmente mas não de forma consistente para permitir diferenciar os modos de produção.

Carrapiso et al. (2020) estudaram o efeito dos modos de produção (biológica vs. convencional) e dos métodos de colheita (consideraram a apanha diretamente da árvore e a apanha do solo) na qualidade química e na composição volátil de azeite da variedade Verdial de Badajoz. De notar que o tipo de fertilização foi diferenciado - no modo convencional utilizaram um complexo de azoto, fósforo, potássio e boro e no orgânico, uma mistura de resíduos de poda e feno com caroço de azeitona compostado. Identificaram 145 compostos voláteis, dos quais, 34, parecem estar relacionados com o modo de produção. Os compostos identificados são: (Z)-Pent-2-enal, (E)-Pent-2-enal, Pent-1-en-3-one, Pentan-3-one, Pent-1-en-3-ol, Pent-2-en-1-ol, (Z)-Hex-3-enal, Hexanal, (E)-Hex-2-enal, (Z)-Hex-3-en-1-ol, (E)-Hex-2-en-1-ol, 1-Hexanol e Hexil acetato.

Relativamente às diferenças entre variedades, independentemente do modo de produção, os compostos que apresentaram diferenças significativas foram: 3-Ethyl-1,5-octadiene, (E)-2-Octenal (apenas para as variedades Galega e Cobrançosa, pois não foi detetado na Arbequina), Benzaldeído e éster metílico de ácido benzóico. Estes compostos apresentam diferenças entre as três variedades.

Peres et al. (2013) analisaram o perfil volátil de azeites virgem extra de Galega e Cobrançosa. Identificaram nove compostos com poder discriminante entre as amostras (diferentes variedades), no entanto, o (E)-2-octenal não consta como um dos compostos.

A aplicação da análise estatística é fundamental, para averiguar e expressar com clareza diferenças significativas nos dados obtidos. No entanto, é importante referenciar que o número de amostras em análise é muito pequeno, condicionando fortemente a validade das conclusões que se podem retirar.

5. Conclusão

Alguns estudos relacionam o modo de produção dos azeites com a qualidade química e organolética dos mesmos (Carrapiso et al., 2020; Ninfali et al., 2007; Gutiérrez et al., 1999). Os resultados apontam para a existência de algum tipo de associação entre estes fatores, mas, em geral, referem-se a estudos realizados com dados de apenas um ano ou com um número muito reduzido de amostras, o que não permite uma generalização dos resultados.

Ninfali et al. (2007), referencia que a qualidade do azeite e, por conseguinte, a sua composição química está fortemente dependente de uma série de fatores e da sua interação. De entre os fatores mencionados são de destacar: a cultivar/variedade, o nível de maturação do fruto e as condições edafoclimáticas. O processo de extração e armazenamento do azeite também é mencionado como tendo influência nas alterações químicas no azeite.

É de realçar a escassa literatura que aborda os modos de produção -biológica e convencional, e o seu efeito no perfil volátil dos azeites, o que motivou o estudo desenvolvido nesta dissertação. Assim, a realização de estudos e disponibilização de mais informação sobre esta temática torna-se importante, no contexto da valorização dos azeites obtidos por estas práticas agrícolas, nomeadamente a biológica, a qual tem vindo a assumir um crescimento significativo.

É de referir que o modo de produção (biológico vs. convencional) no perfil fenólico dos azeites já foi alvo de estudo por López-Yerena et al. (2019). O estudo desenvolvido refere que o teor em polifenóis do azeite virgem extra depende de fatores como os sistemas de produção envolvidos, o nível de maturação das azeitonas, a tecnologia utilizada no processo de produção e o armazenamento. Os polifenóis são compostos importantes na medida em que contribuem para a estabilidade, características organoléticas e valor nutricional dos azeites. Em concreto, neste estudo é reportado que, o total de fenóis detetado foi 26% superior no azeite biológico relativamente ao azeite de produção convencional.

Um dos fatores que López-Yerena et al. (2019) mencionam é que a síntese dos compostos fenólicos está interligada com a fertilização, e que em que frutos provenientes de produção orgânica, o teor de fenóis é superior ao de frutos em que as plantas foram sujeitas a uma fertilização convencional.

O factor fertilização já foi abordado por Gutiérrez et al. (1999), no que toca ao efeito nos parâmetros químicos da qualidade. O tipo de fertilização realizada nos modos de produção “ecológico” e convencional na variedade Picual, revelou que os azeites de produção “ecológica” apresentam qualidade superior (valores de acidez e índice de peróxidos mais baixos e uma

estabilidade oxidativa e avaliação organolética superior). Contudo, nos ensaios desenvolvidos no âmbito desta dissertação essa tendência não foi observada.

É de realçar que, nos estudos desenvolvidos por Gutiérrez et al. (1999), apenas se restringiram a azeite de uma campanha apenas, e que não estudaram os compostos voláteis e uma possível relação entre estes e o modo de produção.

Muitos autores atribuem as diferenças que se encontram no perfil volátil a fatores como a variedade (Peres et al., 2013), a localização geográfica (Zunin et al., 2005), os métodos e altura de colheita (Carrapiso et al., 2020).

A congruência entre os resultados dos vários estudos não é muito forte, o que não permite afirmar com certeza se os diferentes modos de produção influenciam a qualidade do azeite tanto quanto seria expectável. Em estudos realizados durante um espaço de tempo mais longo, existem diferenças nos resultados de ano para ano em algumas situações, mas o que muitos autores concluem é que as diferenças podem estar mais interligadas às variações ambientais que vão existindo de ano para ano (Ninfali et al., 2007).

Em suma, este trabalho permitiu a implementação de uma metodologia analítica que integra um método de preparação de amostra seletiva e eficiente para os compostos voláteis (HSPME) e o desenvolvimento de um método cromatográfico por GC-TOF-MS, que permitiu a análise e a identificação de um total de 84 compostos voláteis. De facto, o número de amostras que se conseguiram recolher para o estudo é muito reduzido, comprometendo, uma clara e inequívoca, identificação de eventuais “compostos marcadores” e diferenciadores dos modos de produção biológica e de produção integrada.

Apesar das limitações que o estudo apresenta, em grande parte relacionadas com o reduzido número de amostras de azeite em análise, parece indicar que os compostos: 4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene, 1-Nonanol, α -Farnesene e Álcool feniletílico apresentam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) nos azeites Galega MPB vs. Galega MPI, Cobrançosa MPB vs. Cobrançosa MPI e Arbequina MPB vs. Arbequina MPI, podendo ser apontados como potenciais candidatos a “compostos marcadores” para a diferenciação de azeites dos dois modos de produção (biológica e integrada). Contudo, estes “putativos compostos marcadores” necessitam de investigação mais detalhada.

Assim, o trabalho experimental desenvolvido no âmbito desta dissertação centrado em “explorar uma estratégia para a diferenciação de azeites em MPB e MPI” permitiu implementar metodologias que serão uma mais-valia e que servirão de guia para estudos mais alargados.

Numa perspetiva futura, é interessante a continuidade deste estudo, utilizando um maior número de amostras e durante um período de tempo mais alargado, de modo a permitir reunir um conjunto de dados mais alargado que permitisse uma análise quimiométrica dos dados, contribuindo assim, para a implementação de um método que permitisse a identificação de “compostos marcadores” possibilitando a diferenciação de azeites dos modos de produção biológica e produção integrada.

6. Referências Bibliográficas

- Agencia Portuguesa do Ambiente (2023, 19 maio). *Área agrícola em modo de produção biológico*. Portal do Estado do Ambiente. <https://rea.apambiente.pt/content/%C3%A1rea-agr%C3%ADcola-em-modo-de-produ%C3%A7%C3%A3o-biol%C3%B3gico>
- Agrobio. (Sem data). *O que é a Agricultura Biológica?*. <https://agrobio.pt/agricultura-biologica/o-que-e/>
- Agrobio. (sem data). *Proteção das plantas: Gestão das adventícias (infestantes)*.
- Agroportal (2022, novembro 02). *Produção mundial de azeite atinge 3,2 milhões de toneladas e triplicou nos últimos 60 anos*. <https://www.agroportal.pt/producao-mundial-de-azeite-atinge-32-milhoes-de-toneladas-e-triplicou-nos-ultimos-60-anos/>
- Andrade, T. (2018). *Azeites de Agricultura Biológica: Valorização do Azeite Virgem de Idanha-a-Nova* (Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Castelo Branco). Repositório Científico do Instituto Politécnico de Castelo Branco. <http://hdl.handle.net/10400.11/6149>
- Andrade, T., Paulo, L. & Peres, M.F. (2013, novembro 27). *Avaliação de ceras, ésteres etílicos e metílicos em azeites virgens monovarietais* (Comunicação oral). II Jornada Potencial Técnico e Científico do IPCB, Castelo Branco. <http://hdl.handle.net/10400.11/2295>
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.093>
- Associação Portuguesa dos Nutricionistas. (2014). *Dieta Mediterrânica – um padrão de alimentação saudável*. APN. ISBN: 978-989-8631-15-2
- Arbonés, A., Rufat, J., Pérez, M.A., Pascual, M., Benito, A., de Lorenzo, C., Villar, J.M., & Sastre, B. (2022). The influence of olive tree fertilization on the phenols in virgin olive oils. A review. *Grasas y Aceites*, 73(3), 1-4. <https://doi.org/10.3989/gya.0565211>
- Arruda, J. (2018). *Estudo da correlação entre parâmetros físico químicos do azeite e a análise sensorial* (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa). Repositório da Universidade Nova. <http://hdl.handle.net/10362/55167>
- Azeol. (s.d.). *Óleo de Bagaço de Azeitona*. <https://www.azeol.pt/>
- Barros, J. F. C., Freixial, R. M. C. (2011). *Controlo Mecânico de Infestantes*. Universidade de Évora. <http://hdl.handle.net/10174/3090>
- BCSD Portugal. (2021). *O que é a sustentabilidade*. <https://bcdsptugal.org/sustentabilidade/>

- Boskou, D. (2011). Olive Oil. In F. D. Gunstone (Ed.), *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses* (pp.243–271). Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/9781444339925.ch9
- C.M. Sempiterno, C. M., & Fernandes, R.M. (2018). Efeito da aplicação ao solo de água-ruça, bagaço de azeitona e um composto sobre os teores de azoto total e mineral e de carbono orgânico. *Revista de Ciências Agrárias*, 33(1), 80-87. <https://doi.org/10.19084/rca.15765>
- Carapinha, P.G. (2012). *Utilização do azeite na fritura de alimentos* (Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia). Repositório da Universidade de Lisboa <http://hdl.handle.net/10400.5/5317>
- Carrapiso, A. I., Rubio, A., Sánchez-Casas, J., Martín, L., Martínez-Cañas, M., & de Miguel, C. (2020). Effect of the Organic Production and the Harvesting Method on the Chemical Quality and the Volatile Compounds of Virgin Olive Oil over the Harvesting Season. *Foods*, 9(12), 1766. <https://doi.org/10.3390/foods9121766>
- Carvalho, M. (2012) O Uso Sustentado do Solo. *Revista da Feira do Montado, XIII Feira do Montado*, Portel: 14-17.
- Comissão Europeia. (s.d.). *Azeite – Panorâmica da produção e do comércio do azeite na UE*. https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/olive-oil_pt
- Conceição, B. (2020). *Caracterização Química e Sensorial de Azeites de Montanha* (Dissertação de Mestrado, Escola Superior Agrária). Repositório Científico do Instituto Politécnico de Castelo Branco. <http://hdl.handle.net/10400.11/6963>
- Confederação dos Agricultores de Portugal. (2022). Newsletter Azeite. https://www.rederural.gov.pt/images/Noticias/2022/Newsletter_Azeite_-_Abril_2022.pdf
- 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). Repositório Aberto da Universidade do Porto. <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/81534>
- Da Silva, M.G., Freitas, A.M.C., Cabrita, M.J.B., Garcia, R. (2012). Olive Oil Composition: Volatile Compounds. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions* (pp.18-46). InTech. DOI: 10.5772/1378

- Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro. (sem data). *Poda do olival*.
https://www.drappc.gov.pt/base/documentos/poda_olival.pdf
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. (Sem data). *Produção Integrada*.
<https://www.dgadr.gov.pt/producao-integrada>
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. (Sem data). *Modo de Produção Biológico*.
<https://www.dgadr.gov.pt/19-modos-de-producao-sustentavel/91-prodbiologica>
- Du, X., & Zeisel, S. H. (2013). Spectral deconvolution for gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics: current status and future perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4(5), 1-8. <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201301013>
- EDIA. (2022). *Anuário Agrícola de Alqueva 2021*. Empresa de Desenvolvimento e Infra-Estruturas de Alqueva, S.A. <https://www.edia.pt/wp-content/uploads/2022/03/AnuarioAgricolaAlqueva2021.pdf>
- Espadas-Aldana, G., Vialle, C., Belaud, J.-P., Vaca-Garcia, C., & Sablayrolles, C. (2019). Analysis and trends for Life Cycle Assessment of olive oil production. *Sustainable Production and Consumption*, 19(2019), 216-230. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2019.04.003>
- Eurostat. (2022, 21 dezembro). *Developments in organic farming*. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Developments_in_organic_farming
- Ferreira, A. (2012). *Influência da luz nos parâmetros químicos de qualidade em azeites monovarietais* (Dissertação de Mestrado, Universidade de Évora). Repositório da Universidade de Évora. <http://hdl.handle.net/10174/14863>
- Forgács, E., & Cserhádi, T. (2003). Gas chromatography. In M. Lees (Ed.), *Food Authenticity and Traceability*, (pp.197–217). <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>
- Foscolou, A., Critselis, E., & Panagiotakos, D. (2018). Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas* 118(2018), 60-66. [doi:10.1016/j.maturitas.2018.10.013](https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.10.013)
- Gutiérrez, F., Arnaud, T., & Albi, M. A. (1999). Influence of ecological cultivation on virgin olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(5), 617–621. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0012-8>
- Instituto Nacional de Estatística. (2022). *Estatísticas Agrícolas: 2021*. <https://www.ine.pt/xurl/pub/31589846>

- International Olive Council. (2022). *Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils*. COI/T.15/NC No 3/ Rev.18, June 2022. <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/>
- Jalali-Heravi, M., & Parastar, H. (2010). Assessment of the co-elution problem in gas chromatography-mass spectrometry using non-linear optimization techniques. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 101(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.11.010>
- Jiménez, B., Rivas, A., Lorenzo, M. L., & Sánchez-Ortiz, A. (2017). Chemosensory characterization of virgin olive oils obtained from organic and conventional practices during fruit ripening. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(4), 294–304. <https://doi.org/10.1002/ffj.3387>
- Jurado-Campos, N., García-Nicolás, M., Pastor-Belda, M., Bußmann, T., Arroyo-Manzanares, N., Jiménez, B., Viñas, P., & Arce, L. (2021). Exploration of the potential of different Analytical techniques to authenticate organic vs. conventional olives and olive oils from two varieties using untargeted fingerprinting approaches. *Food Control*, 124, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107828>
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>
- Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., & Crowther, J. C. (2007). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9120-9>
- Karasak, F. W., & Clement, R. E. (1988). *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-12062-7>
- Kiritsakis, A. K. (1998). Flavour components of olive oil-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673–681. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0205-6>
- Lopes, J., Pavão, F., Rodrigues, M. (2009). Colheita da azeitona. In M.A. Rodrigues & C.M. Correia (Eds.), *Manual da safra e contra safra do olival* (pp. 89-94). IPB. <http://hdl.handle.net/10198/4191>
- López-Yerena, A., Lozano-Castellón, J., Olmo-Cunillera, A., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P., Jiménez, B., Pérez, M., & Vallverdú-Queralt, A. (2019). Effects of Organic and Conventional Growing Systems on the Phenolic Profile of Extra-Virgin Olive Oil. *Molecules*, 24(10), 1986. <https://doi.org/10.3390/molecules24101986>

- Lourenço, C., Luz, P., Ramos, A., Peres, F. (2019). Boas Práticas Culturais de Produção para os Azeites de Montanha. ISBN 978-989-8196-81-1
- Lusa (2022, novembro 02). *Portugal deve ter “produção recorde” de azeite na campanha de 2021/2022*. Agroportal. <https://www.agroportal.pt/portugal-deve-ter-producao-recorde-de-azeite-na-campanha-de-2021-2022/>
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Bissaro, C., Leimann, F., Casal, S., Ramalhosa, E., & Pereira, J.A. (2017). Improvement of sensorial and Volatile profiles of olive oil by addition of olive leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(11), 1-33. Doi:10.1002/ejlt.201700177
- Martins, N.M.C. (2011). *Composição aromática de aparas de madeira para uso enológico* (Dissertação de Mestrado, Universidade de Évora). Repositório da Universidade de Évora. <http://hdl.handle.net/10174/15480>
- Mühlen, C. v. (2009). Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*, 1(3), 21-24.
- Neves, B., & Pires, I. M. (2018). The Mediterranean Diet and the Increasing Demand of the Olive Oil Sector: Shifts and Environmental Consequences. *Region*, 5(1), 101–112. <https://doi.org/10.18335/region.v5i1.219>
- Ninfali, P., Bacchiocca, M., Biagiotti, E., Esposto, S., Servili, M., Rosati, A., & Montedoro, G. (2008). A 3-year Study on Quality, Nutritional and Organoleptic Evaluation of Organic and Conventional Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 85(2), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1171-0>
- Palma, R. (2022). *Azeite de primeira extração versus azeite de repasse*. (Dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Beja). Repositório Científico do Instituto Politécnico de Beja. <https://hdl.handle.net/20.500.12207/5761>
- Peres, F., Jeleń, H. H., Majcher, M. M., Arraias, M., Martins, L. L., & Ferreira-Dias, S. (2013). Characterization of aroma compounds in Portuguese extra virgin olive oils from Galega Vulgar and Cobrançosa cultivars using GC–O and GC×GC–ToFMS. *Food Research International*, 54(2), 1979–1986. doi:10.1016/j.foodres.2013.06.015
- Pulleman, M. M., Bouma, J., van Essen, E. A., & Meijles, E. W. (2000). Soil Organic Matter Content as a Function of Different Land Use History. *Soil Science Society of America Journal*, 64(2), 689. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.642689x>

- Regulamento (UE) 2018/848 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de maio de 2018. Jornal Oficial da União Europeia: L 150. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A02018R0848-20230221>
- Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 da Comissão de 29 de julho de 2022. (2022). Jornal Oficial da União Europeia: L 284/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32022R2104>
- Reiners, J., & Grosch, W. (1998). Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavour Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2754–2763. <https://doi.org/10.1021/jf970940b>
- República Portuguesa. (2021, 1 outubro). *Olivicultura e Azeite*. Portal da Agricultura. <https://agricultura.gov.pt/olivicultura-e-azeite>
- Rodrigues, Â. & Cabanas, J.E. (2007). As Infestantes. In J. Azevedo (Ed.), *Manual de Proteção Integrada do Olival* (pp. 357-374). <http://hdl.handle.net/10198/3002>
- Sahin, O., & Aydin, A. (2017). A Cultural, Gastronomic, and Touristic Asset: The Kuşadası Oleatrium Olive and Olive Oil History Museum Case. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 5(4), 180-199. Doi:10.21325/jotags.2017.145
- Salas, J. J., Harwood, J. L., Martínez-Force, E. (2013). Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. Em R. Aparicio & J. Harwood (Eds), *Handbook of Olive Oil* (pp. 108-110). Handbook of Olive Oil. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_4
- Salgueiro, C., Anjos, O., & Peres, F. (2019). Boas Práticas no Lagar: Qualidade e Segurança. Promoção e Valorização de Azeites de Montanha. ISBN 978-989-8196-83-5.
- Salucci, S., Bartoletti-Stella, A., Bavelloni, A., Aramini, B., Blalock, W. L., Fabbri, F., Vannini, I., Sambri, V., Stella, F., & Faenza, I. (2022). Extra Virgin Olive Oil (EVOO), a Mediterranean Diet Component, in the Management of Muscle Mass and Function Preservation. *Nutrients*, 14(17), 7-8. <https://doi.org/10.3390/nu14173567>
- Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., Sanz, C., & Pérez, A. G. Synthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil Is Limited by the Lipoxygenase Activity Load during the Oil Extraction Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 812-822. <https://doi.org/10.1021/jf204241e>
- Saramago I. (2009). *Olival em Modo de Produção Biológico* (Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico de Beja). Repositório Digital do Instituto Politécnico de Beja. <http://hdl.handle.net/10400.26/3979>

- Silva, K., Rodrigues, N., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2021). Compostos voláteis em azeites virgens: caracterização e importância no perfil sensorial. *TecnoAlimentar*, 28, 22-24. <http://hdl.handle.net/10198/27713>
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In E. Stauffer, J. Dolan & R. Newman, *Fire Debris Analysis* (235–293). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>
- Teixeira, P. (2015). *Contributo para a caracterização do azeite extraído na área de influência da Cooperativa dos Olivicultores de Valpaços* (Dissertação de Mestrado, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança). Biblioteca Digital do Instituto Politécnico de Bragança. <http://hdl.handle.net/10198/12726>
- Volakakis, N., Kabourakis, E., & Leifert, C. (2017). Conventional and organic cultivation and their effect on the functional composition of olive oil. Em F. Shahidi & A. Kiritsakis (Eds.), *Olives and Olive Oil as Functional Foods* (pp. 35–43). Wiley. doi:10.1002/9781119135340.ch3
- Volakakis, N., Kabourakis, E., Kiritsakis, A., Rempelos, L., & Leifert, C. (2022). Effect of Production System (Organic versus Conventional) on Olive Fruit and Oil Yields and Oil Quality Parameters in the Messara Valley, Crete, Greece; Results from a 3-Year Farm Survey. *Agronomy* 12(1484), 1-13. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071484>
- Žanetić, M., Špika, M. J., Ožić, M. M., & Bubola, K. B. (2021). Comparative Study of Volatile Compounds and Sensory Characteristics of Dalmatian Monovarietal Virgin Olive Oils. *Plants*, 10(1995), 1-18. <https://doi.org/10.3390/plants10101995>
- Zunin, P., Boggia, R., Salvadeo, P., & Evangelisti, F. (2005). Geographical traceability of West Liguria extravirgin olive oils by the analysis of volatile terpenoid hydrocarbons. *Journal of Chromatography*, 1089(1-2), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.005>