



**Estudo da adição de folhas de oliveira durante o processo de extração na composição química e perfil sensorial de azeite virgem Cv. Cobrançosa utilizando Metodologia de Superfície de Resposta**

**Camila Andressa Bissaro**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por:

**Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira**

**Prof. Doutora Fernanda Vitória Leimann**

Bragança

2015

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS** pela dádiva da vida, pelo dom da inteligência, por ser alimento em minha vida. Por mostra-se presente em todos meus passos, por tornar-me forte, acalmar minhas angústias e pela minha eterna gratidão.

A minha **FAMÍLIA**, em especial aos meus pais e minha irmã, que apesar da distância, nunca falharam em suas funções, por tanto suporte, ensinamentos e confiança. Por acolher-me nas dificuldades e vibrar nas minhas vitórias, por ensinar-me a nunca perder a minha essência e acreditar nas minhas capacidades. Essa vitória é inteiramente nossa.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por essa oportunidade, juntamente com o Instituto Politécnico de Bragança, por proporcionar-me tamanho aprendizado, crescimento e experiência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Alberto Cardoso Pereira, primeiramente pela oportunidade concebida, por tantos ensinamentos e disponibilidade. A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Vitória Leimann, por toda atenção e ensinamentos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Susana Casal, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por toda a ajuda nas determinações laboratoriais. Ao Engenheiro Nuno Rodrigues e ao Doutor. Ricardo Malheiro, meus companheiros de investigação, sou eternamente grata a vocês, por incentivar-me ao meu melhor, através de muita paciência, orientação e profissionalismo. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elsa Ramalhosa pela contribuição neste trabalho.

Aos demais alunos da UTFPR, os quais eu tive a honra em conhecer e poder compartilhar todos os momentos, pelo laço que criamos e por tornarmos família uns aos outros. Em especial a Franciely Oliveira, por ter feito um papel muito importante nessa caminhada, por tanto zelo e afeto. A Bárbara Martins, além da minha gratidão pela grande ajuda laboratorial, por tanto companheirismo, ensinamentos e suporte. Os momentos mais memoráveis da minha vida, foi com vocês.

Aos verdadeiros amigos que fiz durante a vida e fizeram-se presentes, e aos novos. Em especial, a Natália Sofia, o qual parabeno pelo excelente trabalho e por acolher-me com tanto carinho. “**Veni, vidi, vici**” (*Julius Caesar*).

Aos meus pais.



## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
ÍNDICE DE QUADROS .....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
2.1. Composição Química.....	9
2.2. Aspectos a considerar na melhoria da qualidade dos azeites.....	14
2.2.1. Folhas de oliveira.....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Utilização de um desenho fatorial para a avaliação do efeito das condições experimentais sobre a adição de folhas durante o processo de extração. ....	23
3.2. Colheita das azeitonas.....	24
3.3. Extração do azeite e preparação dos ensaios de azeite .....	24
3.4. Parâmetros avaliados nas amostras de azeite obtidas .....	26
3.4.1. Parâmetros de qualidade .....	26
3.4.1.1. Acidez .....	26
3.4.1.2. Índice de peróxido .....	27
3.4.1.3. Espectrofotometria no ultravioleta.....	28
3.4.1.4. Avaliação sensorial .....	28
3.5. Composição .....	29

3.5.1. Composição em ácidos gordos .....	29
3.5.2. Composição em tocoferóis.....	30
3.5.3. Perfil de compostos voláteis .....	31
3.6. Atividade antioxidante .....	32
3.6.1. Determinação do teor em fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol totais .....	32
3.6.2. Estabilidade oxidativa pelo método Rancimat.....	33
3.6.3. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•) .....	33
3.6.4. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS•+) .....	34
3.7 .Determinação da cor .....	34
3.8. Análise estatística .....	35
3.8.1. Análise de variância.....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1. Parâmetros de Qualidade .....	39
4.2. Análise Sensorial .....	43
4.3. Composição.....	47
4.3.1. Ácidos gordos .....	47
4.3.2. Composição em tocoferóis.....	50
4.3.3. Teor em Fenóis Totais .....	52
4.4. Atividade sequestradora de radicais livres.....	53
4.4.1. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•) .....	53
4.4.2. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS•+) .....	55
4.5. Estabilidade oxidativa.....	55

4.6. Determinação da cor .....	56
4.7. Composição Volátil .....	57
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura de um triglicérido (R - grupo acilo). .....	9
<b>Figura 2.</b> Folhas da oliveira da Cv.Cobrançosa.....	19
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das diferentes fases do processo de extração usando uma linha do tipo Abencor. ....	25
<b>Figura 4.</b> Sensações olfativas, gustativa retronasal e olfativa gustativa de azeites com diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura.....	46
<b>Figura 5.</b> Resistência à oxidação, em horas, de azeites com diferentes percentagens de folhas e diferentes tempo de batadura. ....	55
<b>Figura 6.</b> Teor dos compostos voláteis maioritários em relação a à percentagem de folhas (0, 5 e 10%) e tempo de batadura (20, 30 e 40 min.) para os compostos A - ( <i>E</i> ) - 2-hexenal (mg/kg); B - ( <i>Z</i> ) -3-hexenal (mg/kg); C - ( <i>Z</i> ) -3-hexen-1-ol acetato (mg/kg). .....	58

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Limites estabelecidos para a composição dos azeites virgens <sup>1</sup> em ácidos gordos. ....	10
<b>Quadro 2.</b> Condições experimentais, com a conjugação das diferentes variáveis em estudo, nomeadamente percentagem de adição de folha e tempo de batadura, para aplicação da metodologia de superfície de resposta. ....	23
<b>Quadro 3.</b> Gradientes utilizados para determinar os componentes hidroxitirosol e tirosol (mg/kg) dos azeites com diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura. ....	33
<b>Quadro 4.</b> Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico ); índice de peróxido (mEq.O <sub>2</sub> /kg); k <sub>232</sub> ; k <sub>270</sub> e Δk] do azeite extraído com diferentes percentagens de folha e tempo de batadura das pastas (média ± desvio padrão). ....	40
<b>Quadro 5.</b> Valores médios para o parâmetro sensorial com a adição de diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão). ....	45
<b>Quadro 6.</b> Perfil em ácidos gordos (g/100 g de ácidos gordos) de azeites Cv. Cobrançosa, extraídos com diferentes percentagens de adição de folhas de oliveira e diferentes tempo de batadura das pastas (média ±desvio padrão). ....	49
<b>Quadro 7.</b> Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados extraídos em diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão). ....	50
<b>Quadro 8.</b> Composição em tocoferóis (mg/kg) de azeites da Cv. Cobrançosa extraídos com diferentes percentagens de adição de folhas de oliveira e diferentes tempo de batadura das pastas (média ±desvio padrão). ....	51
<b>Quadro 9.</b> Valores médios para o teor em fénois totais (mg/kg), hidroxitirosol totais (mg/kg) e tirosol totais (mg/kg) para diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão). ....	53
<b>Quadro 10.</b> Valores para os parâmetros DDPH e ABTS em azeites com diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão). ....	54
<b>Quadro 11.</b> Valores médios para a determinação da cor, modo CIELAB (L*, a* e b*) e HUNTER (L, a e b) para azeites com diferentes percentagem de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão). ....	59
<b>Quadro 12 .</b> Perfil volátil de azeites da Cv. Cobrançosa (mg/kg; valores a negrito estão expressos em µg/kg) extraídos com diferentes percentagens de folhas de oliveira e diferentes tempos de extração ( média ± desvio padrão). ....	61



## RESUMO

O azeite é o óleo vegetal extraído da azeitona (*Olea europaea* L.). A sua qualidade está diretamente relacionada com as características e composição da azeitona e com o processo de extração, nomeadamente o tempo de batadura das pastas. As folhas das oliveiras são ricas em compostos antioxidantes e alguns trabalhos indicam que a sua adição durante o processo de extração pode melhorar quer a composição química quer o perfil sensorial dos azeites extraídos. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo aplicar a metodologia de superfície de resposta para otimização da escolha da quantidade de folha a adicionar durante o processo de extração (0, 5 e 10 %); e do tempo de batadura das pastas (20, 30 e 40 minutos), na qualidade e composição de azeites da Cv. Cobrançosa. Foram selecionados 13 eventos de combinação de ambos os fatores, com três repetições, e nos azeites obtidos foram avaliados os parâmetros de qualidade, a composição (ácidos gordos, tocoferóis e voláteis), a atividade antioxidante, e a cor. Os resultados indicam que a adição de folhas juntamente com o tempo de batadura influi ao nível de alguns parâmetros de qualidade e da composição química dos azeites extraídos. A adição de folhas apesar de ter um efeito positivo ao nível da qualidade e composição, mostrou influir negativamente nos parâmetros relacionados com a oxidação. As adições de folhas, juntamente com o tempo de batadura, exerceram um efeito positivo nas sensações de frutado e verde e influenciou a composição em ácidos gordos, com diminuição do teor em ácido oleico e aumento do linoleico, sendo os ácidos gordos monoinsaturados, influenciados com tempos extremos de batadura. A adição de folhas durante a extração pareceu exercer um efeito negativo na estabilidade e atividade antioxidante dos azeites extraído o que estará relacionado com a incorporação de clorofilas. Na fração volátil, identificaram-se 22 compostos, entre eles o (*E*)-2-hexanal, o (*Z*)-3-hexenal e o (*Z*)-3-hexen-1-ol que foram influenciados quer pela adição de folhas e tempo de batadura.

Palavras-chaves: metodologia de superfície de resposta, composição química, antioxidantes, análise sensorial, azeite.

## ABSTRACT

The olive oil is the vegetable oil extracted from olives (*Olea europaea* L.). Its quality is directly related to the characteristics and composition of the olive and the extraction process, and in particular with time taken during paste malaxation. The leaves of the olive tree are rich in antioxidants and some studies indicate that their addition during the extraction process can improve both the chemical composition or the sensory profile of the extracted oils. In this sense, the present study aimed to apply the response surface methodology to optimize the choice of the amount of olive leaves to be added during the extraction process (0, 5 and 10%); and olive paste malaxation time (20, 30 and 40 minutes), in the quality and composition of oils from Cv. Cobrançosa. Were selected 13 events of combination of both factors, with three replicates, and the obtained olive oils were evaluated for quality parameters, composition (fatty acids, tocopherols and volatiles), antioxidant activity, and color. The results indicate that the addition of olive leaf together with the malaxation time influence some quality parameters and the chemical composition of the extracted oil. The addition of olive leaf, despite having a positive effect on the quality and composition, showed to influence negatively the parameters related to oxidation. The addition of olive leaf, together with the time malaxation, had a positive effect on the fruity and green sensations; and influence the fatty acid composition, with a decrease in oleic acid and an increase in linoleic acid content, being monounsaturated fatty acids influenced by extreme malaxation times. Addition of olive leaf during extraction appear to have a negative effect on the antioxidant activity and stability of the oil extracted which might be associated with the incorporation of chlorophylls. In the volatile fraction, 22 compounds were identified, including the (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenal and (*Z*)-3-hexen-1-ol, which were affected by addition of leaves and time of malaxation.

Keywords: response surface methodology, chemical composition, antioxidants, sensory analysis, olive oil.



## 1. INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

O azeite é o óleo comestível obtido diretamente do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.) em condições adequadas de processamento e higiene. Este óleo é obtido através de processos tecnológicos apropriados, proporcionando características organoléticas excepcionais. É praticamente o único que pode ser consumido cru, devido a não utilização de agentes químicos durante o processo de extração. Com isso, conserva íntegro o seu teor de vitaminas, ácidos gordos e outros componentes de menores importância nutricional (Gila et al., 2015).

Este óleo vegetal é obtido exclusivamente por processos físicos e mecânicos em condições térmicas que não provoquem alterações na sua composição. Assim, de acordo com o processo de extração, o azeite é chamado de azeite virgem (Sacchi et al., 2015). O princípio fundamental da extração, independentemente do método escolhido, requer primeiramente que os frutos sejam moídos e reduzidos a pasta por meio de um processo de moenda e batidura, respectivamente, com posterior separação de fases, separando o azeite (Clodoveo, 2012).

Os azeites são classificados comercialmente em diferentes categorias, isto é, Azeite Virgem Extra, Azeite Virgem e Azeite Lampante, classificação feita em função da pontuação na análise sensorial e dos valores de acidez, índice de peróxidos, valores  $k_{232}$ ,  $k_{270}$ ,  $\Delta k$  e ésteres alquílicos, parâmetros que estão definidos pelo Regulamento (CEE) n° 2568/91 e suas alterações subsequentes.

O azeite virgem extra é o que apresenta melhor qualidade, as suas características organoléticas e químicas devem manter todas as propriedades do óleo quando está no fruto, conservando assim grande quantidade de compostos antioxidantes e aromáticos (Luna et al., 2006; Jorge, 2010). Por outro lado, comparando com os demais óleos vegetais, o azeite virgem possui elevada resistência à oxidação. Esse fato, é devido à sua composição de ácidos gordos, majoritariamente monoinsaturados, predominantemente o ácido oleico. Bem como à grande quantidade de compostos antioxidantes, sendo a maioria polifenóis, que são essenciais na manutenção das propriedades nutricionais, na definição do tempo de prateleira e nas propriedades organoléticas do azeite ( Servili et al., 2009 a).

O azeite virgem extra é mundialmente apreciado pelo seu sabor e potencial nutracêutico em função de diversos benefícios a saúde. O seu sabor e aroma é caracterizado por vários componentes voláteis: aldeídos, álcoois, hidrocarbonetos, ésteres, cetonas, furanos, e outros voláteis não identificados (Ben Mansour et al., 2015).

A azeitona sofre constantes alterações durante o amadurecimento do fruto, sendo necessário determinar um tempo de colheita óptimo para cada cultivar, para obter azeites de alta qualidade e com maiores teores de antioxidantes, elevando os benefícios para a saúde dos consumidores (Ouni et al., 2011). Estudos recentes, relatam que o teor de compostos fenólicos nos azeites virgens alteram-se com a cultivar, e também pela origem geográfica. Com isso, o teor de antioxidante nos azeites não são constantes, devido ao estágio de maturação do fruto, condições agroclimáticas e técnicas oleícolas (Franco et al., 2014). Além disso, o efeito antioxidante dos compostos fenólicos de azeite depende de outros fatores tais como a composição química, a solubilidade lipídica, a capacidade de eliminar os radicais livres, o número de átomos de hidrogénio que doam e reações em cadeia de radicais livres associada (Povie et al., 2012).

Vários são os aspetos que podem melhorar o teor em antioxidantes, e consequentemente a sua ação, nos azeites. Estes fatores vão desde a colheita da azeitona no momento adequado, ou seja, no ponto considerado óptimo de colheita, que corresponde ao compromisso entre a máxima quantidade de azeite e que ele apresente as melhores características, devendo ocorrer o controlo periódico das azeitonas para a sua determinação (Sousa et al., 2014). Uma alternativa para melhoria da composição de antioxidantes do azeite é a adição de folhas de oliveira, conhecidas por serem ricas em antioxidantes naturais, como compostos fenólicos, a azeitonas em sobrematuração, durante o processo de extração do azeite, podem melhorar as características químicas e sensoriais dos azeites (Malheiro et al., 2013). O uso das folhas de oliveira como fonte de antioxidantes para enriquecimento do azeite virgem extra mostra-se viável uma vez que é um subproduto do processo principal que pode ter valor agregado (Roig et al., 2006) e apresentam conteúdo total de compostos fenólicos entre 11 a 40 g/kg de matriz vegetal (Silva et al., 2006).

Durante a batadura mudanças consideráveis na composição química do óleo ocorrem devido a fenômenos de partição entre óleo e água, e vice-versa além da atividade catalítica de enzimas da fruta, que são liberadas durante o esmagamento no rompimento dos tecidos celulares. Esta operação tecnológica determina o equilíbrio

entre a qualidade e a quantidade do óleo extraído por uma variedade de parâmetros como tempo, temperatura, atmosfera em contato com a pasta de azeitona, a adição de água morna e coadjuvantes (Clodoveo, 2012).

Di Vincenzo (2002), avaliou a influência do tempo de batadura para o azeite no teor de ácidos gordos livres, no índice de peróxidos e na avaliação organoléptica. O tempo de batadura da pasta de azeitona foi avaliado de 15 a 90 min e não afetou os parâmetros em questão além de aumentar o rendimento da extração de 75 para 81%. Alguns autores reportam que o aumento no tempo de batadura também favorece o aumento da fração de compostos voláteis no azeite (Reboredo-Rodríguez et al., 2014). Apesar que nem sempre os compostos extraídos e/ou formados neste processo são desejáveis para a qualidade do azeite.

No contexto apresentado, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência dos fatores adição de folhas de oliveira e tempo de batadura das pastas na qualidade, composição e atividade antioxidante do azeite virgem.





---

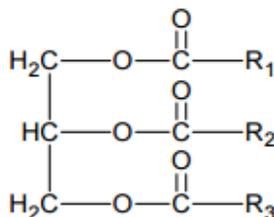
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Composição Química

Durante a formação do óleo nos frutos, os componentes são transformados de mesocarpo de azeitona para o óleo, o qual consiste principalmente de duas frações saponificáveis e insaponificáveis (Ghanbari et al., 2012). A fração saponificável representa de 98-99% do peso total de óleo, composta por ácidos gordos livres, fosfatídeos e triacilgliceróis (Figura 1) sendo insolúvel em água. A fração insaponificável, cerca de 1-2% do peso de óleo é composta por hidrocarbonetos e álcoois gordos. Compostos presentes em menor quantidade são os compostos fenólicos, vitaminas e compostos voláteis, entre outros, sendo os responsáveis pelas características sensoriais. Os demais componentes consistem em tocoferóis, fitosteróis, pigmentos e compostos fenólicos, que contribuem com cerca de 1-2% da composição (Gila et al., 2015; Vaz-Freire et al., 2007).



**Figura 1.** Estrutura de um triglicérido (R - grupo acilo).

Em relação ao perfil lipídico, os ácidos gordos são constituídos por moléculas que apresentam na sua estrutura uma cadeia alquílica, saturada ou insaturada ligada a um grupo carboxílico (-COOH). Em ordem decrescente encontrado nos azeites, são o ácido oleico (C18:1), o ácido palmítico (C16:0), o ácido linoleico (C18:2), o ácido esteárico (C18:0) e o ácido palmitoléico (C16:1) e outros ácidos gordos presentes em quantidades inferiores (Gunstone, 2015).

O Concelho Oleícola Internacional (COI) e a União Europeia, criaram documentos legais que estabelecem limites (Quadro 1), nomeadamente para os ácidos gordos na posição *trans* para cada categoria de azeite. Os azeites virgens extra, não

podem exceder para o caso do C18:1*t* e para a soma dos isômeros C18:2*t* e C18:3*t* o valor de 0,05% (COI, 2006).

Os ácidos gordos do azeite são em geral um dos principais alvo de deterioração deste óleo. Por um lado, as ações que decorrem durante a formação e desenvolvimento do fruto, como o ataque de pragas e doenças, alterações que ocorrem durante a colheita, armazenamento dos frutos e processos de extração, podem originar roturas nas moléculas dos triglicerídeos, ficando alguns ácidos gordos livres (Jorge, 2010). Quanto maior for a quantidade de ácidos gordos livres, maior irá ser a acidez do azeite, e conseqüentemente pior será a sua qualidade. Por outro lado, os ácidos gordos são também os principais motivos do processo oxidativo, a sua oxidação é um sinal de deterioração do azeite (Jorge, 2013).

Os ácidos gordos insaturados, que são maioritários no azeite, são quimicamente mais ativos do que os saturados devido às ligações duplas que possuem, ou seja, quanto mais ligações possuir, maior será sua reatividade. Com isso, essas ligações duplas estão sujeitas a oxidação, polimerização, hidrogenação e isomerização (O'Brien, 2008).

**Quadro 1.** Limites estabelecidos para a composição dos azeites virgens<sup>1</sup> em ácidos gordos.

ÁCIDO GORDO	SIMBOLOGIA	%
Ácido Mirístico	C14:0	0,0 -0,1
Ácido palmítico	C16:0	7,5-20,0
Ácido palmitoleico	C16:1	0,3-3,5
Ácido margárico	C17:0	≤0,3
Ácido esteárico	C18:0	0,5-5,0
Ácido oleico	C18:1	55,0-83,0
Ácido linoleico	C18:2	3,5-21,0
Ácido linolênico	C18:3	≤1,0
Ácido araquídico	C20:0	≤0,6
Ácido Eicosenóico	C20:1	≤0,4
Ácido beénico	C22:0	≤0,2
Ácido lignocérico	C24:0	≤0,2

<sup>1</sup> (% m/m ésteres de metilo); Fonte: COI, 2006.

A oxidação lipídica é desenvolvida por uma série complexa de reações que ocorrem durante a etapa de processamento, armazenamento e transporte. O mecanismo de oxidação começa a tomar lugar imediatamente após a extração do óleo. Devido a isso, a oxidação pode levar a formação de compostos tóxicos, alterando a qualidade e o

valor nutricional do produto final. Podendo ser inibido através do não contato com o oxigênio, inativação de enzimas que catalizam a oxidação e utilização de embalagens adequadas (Mohammadi et al., 2016).

A outra fração de azeite é designada de insaponificável. Apesar de ser uma fração menor, é constituída por vários compostos e proporciona grande importância do ponto de vista biológico. Entre elas a clorofila, que é um dos componentes responsáveis pela pigmentação verde, os carotenoides, que são responsável pela pigmentação amarelada, ambos determinam a coloração de cada azeite. Os componentes voláteis, são característicos por influenciar no odor e no sabor dos azeites. Os polifenóis são fundamentais, devido a sua capacidade antioxidante que influenciam na estabilidade do azeite, conservando contra as reações de degradação (Constante, 2006).

Segundo Chiavaro et al. (2008), a concentração de clorofilas nos azeites depende do sistema de extração escolhido, sendo a extração por centrifugação mais eficiente, apresentando maior teor de clorofilas comparado com o sistema de extração por prensagem. Conforme a maturação do fruto, o teor de clorofilas decresce progressivamente.

Os tocoferóis são considerados como os antioxidantes naturais mais importantes solúvel em lípidos, possuem a capacidade de impedir a peroxidação lipídica por eliminação de radicais em membranas e partículas de lipoproteína. Quatro diferentes tipos de tocoferol são encontrados nos azeites,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol. Além de contribuírem para a capacidade antioxidante, aumentam a estabilidade oxidativa dos azeites.

Guinazi (2009), relatou que o teor médio de  $\alpha$ -tocoferol que se encontra no azeite é de 140,4 mg/kg, o que é condizente com os valores encontrados na literatura (107,0 a 235,0 mg/kg), embora a maior parte dos estudos não tenham detectado outros isômeros além do  $\alpha$ -tocoferol em suas análises.

Outros compostos fundamentais, são os esteróis, que se encontram presentes no azeite como álcoois livres e como ésteres de ácidos gordos (Costa, 2012). O principal esterol presente no azeite é o  $\beta$ -sitosterol em menores quantidades, o estigasterol, colesterol, 24-metileno-colesterol,  $\Delta^7$ -campesterol, entre outros (Machado et al., 2013).

Atualmente, alguns estudos mostram que o teor de esteróis e terpenos é considerado um bom indicador em relação ao estado de maturação da azeitona (Lukić et

al., 2013). Devido ao decréscimo do teor destes compostos, no final da maturação (Baccouri et al., 2008; Lukić et al., 2013; Matos et al., 2007).

A fração fenólica do azeite consiste numa mistura heterogénea de componentes encontrado no mesocarpo da azeitona e não se encontram em qualquer outro óleo vegetal. Os compostos fenólicos são os responsáveis pela maior parte das propriedades antioxidantes dos azeites virgens, o qual proporciona ao azeite características únicas, pois além de ser importante fator do sistema químico de defesa do fruto, possuem atividade antimicrobiana e proteção ao dano oxidativo devido ao efeitos da luz ultravioleta (Morales et al., 2003; Gómez-Alonso et al., 2002) . Segundo Parisi et al., (2014), os polifenóis são muito sensíveis ao calor e a luz, além de possuir baixa solubilidade em água. Esses são algum dos fatores que contribuem para uma fraca estabilidade, diminuindo a eficiência desses compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos possuem a capacidade de alterar a estabilidade quando ocorre a oxidação. Além disso, os polifenóis também contribuem nas propriedades sensoriais dos azeites virgens, participando assim dos atributos positivos que permitem a classificação dos azeites através de um painel de avaliadores. Estão relacionados com a adstringência e o amargor, que é sabor característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes (Morales et al., 2003).

O composto fenólico principal presente nas azeitonas verdes é a oleuropeína, que é o principal responsável pelo amargor dos frutos (Andrewes et al., 2003). Alguns trabalhos demonstraram que o teor de oleuropeína sofre uma diminuição ao longo da maturação, originando posteriormente azeites menos picantes (Matos et al., 2007). Diversos pesquisas destacam as propriedades nutraceuticas atribuídas a oleuropeína e seus derivados hidroxitirosol e tirosol (García-González et al., 2008; Omar, 2010; Tripoli et al., 2005) . Esses compostos são liberados da azeitona para o azeite durante o processo de extração. Em particular, a oleuropeína é abundante em quantidades elevadas nas folhas e frutas não processadas, enquanto maior concentração de hidroxitirosol pode ser encontrado no azeite devido as reações enzimáticas que ocorrem na planta durante a maturação (Bulotta et al., 2014).

A qualidade do azeite baseia-se na percepção do aroma pelos consumidores, e a ausência de defeitos sensoriais. Esta condição é necessária para que seja classificado como "azeite virgem extra". Para a classificação nas diferentes categorias recorre-se a um painel treinado e reconhecido pelo Conselho Oleícola Internacional (COI), onde os

azeites são classificados de acordo com a presença ou ausência de defeitos padronizados e da presença de atributos positivos como o “frutado”, o “amargo” e o “picante” (Procida et al., 2015).

Alterações no teor de compostos voláteis podem modificar notavelmente a percepção olfactiva (Di Giovacchino et al., 1996). Curiosamente, o azeite é atualmente o único produto alimentar que possui regulamentos oficiais em relação aos atributos sensoriais, o qual é realizada através de protocolos padronizados. Os compostos voláteis desempenham um fundamental papel na qualidade sensorial do azeite e grandes esforços têm sido dedicados a desvendar tantos compostos. A distribuição relativa dos voláteis depende de vários parâmetros, como os cultivares, a origem geográfica, amadurecimento dos frutos, práticas de processamento e de armazenamento. No entanto, apesar de um extenso conhecimento sobre a composição volátil do azeite, a avaliação sensorial ainda não foi substituída nem apoiado por qualquer procedimento analítico reconhecido, provavelmente devido a vários aspetos, entre os quais a complexidade da percepção sensorial humana (Purcaro et al., 2014).

Os compostos voláteis são formados pela ação de enzimas lipoxigenase que atuam durante o esmagamento dos frutos e incorporam-se na fase líquida da pasta das azeitonas no processo de termobatedura, sendo responsável pela percepção positiva em relação ao aroma do azeite, esses compostos são posteriormente integrados ao azeite durante o processo de extração mecânica. Os compostos voláteis apresentam baixo peso molecular e a capacidade de vaporizarem em temperatura ambiente, alguns compostos voláteis alcançam o epitélio olfativo, dissolvem-se no muco e podem ligar-se aos receptores olfativos proporcionando a sensação de odor (Rodrigues, 2015).

Segundo estudos de Salta et al. (2007), os azeites apresentam aproximadamente 280 compostos voláteis, sendo os hidrocarbonetos, a classe química mais abundante é seguido pelos álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, derivados de furano, derivados de tiofeno, piranonas, tióis e um composto de pirazina. Apesar dessa complexidade de compostos, apenas 67 são verdadeiramente responsáveis pelo aroma dos azeites, uma vez que muitos deles não estão em quantidade suficiente para serem detectados. Sendo 20 destes compostos voláteis os responsáveis pela detecção de defeitos no sabor do azeite.

## **2.2. Aspectos a considerar na melhoria da qualidade dos azeites**

O tempo de colheita é um parâmetro crítico para a obtenção da qualidade do azeite, durante o processo de maturação da azeitona, pois as características químicas do óleo sofrem várias modificações (Matos et al., 2007). Nas regiões com grande produção de azeitonas, o período de colheita pode decorrer durante vários meses, normalmente começando no final de outubro e podendo ser estendido até fevereiro. Várias variáveis justificam a razão de em algumas regiões ocorrer atraso na colheita, os aspetos sociais é um fator de grande importância, pelo fato da carência da mão de obra de trabalhadores, como também a falta de conhecimento e a faixa etária elevada desses agricultores. No entanto, na maioria das regiões produtoras a capacidade de extração dos lagares de azeite é o problema central, não sendo suficiente para processar todos os frutos no tempo ideal de colheita, sendo necessária o armazenamento das azeitonas (Malheiro et al., 2013).

A obtenção de azeite de qualidade começa a partir da seleção das azeitonas, que devem ser firmes, sãs e além disso não devem apresentar nenhum dano físico na parede celular do fruto. Uma vez que não é suficiente que se tenha domínio da técnica de produção de azeite se a extração for efetuada com frutos impróprios, resultando em um azeite de qualidade inferior e praticamente impossível mascarar o sabor devido a utilização desses frutos (Jorge, 2010).

Com o amadurecimento do fruto, o óleo torna-se menos estável devido a um aumento no teor de ácidos gordos poli-insaturados e um decréscimo no conteúdo total de polifenóis, influenciando na importância comercial do azeite devido as importantes alterações nas características sensoriais e sua vida de prateleira. Frutos colhidos prematuros produzem óleos com alto teor de polifenóis contribuindo para um maior grau de amargor e com maior estabilidade devido ao efeito antioxidante desses polifenóis, porém apresentam características organolépticas inaceitáveis devida a concentrações excessivas desses compostos (Dag et al., 2011). Entretanto, os teores de ácido oleico vão aumentando conforme o processo de maturação do fruto, ou seja, uma colheita tardia dará um azeite mais rico em ácido oleico que uma colheita temporã (Caselli et al., 1993).

Além disso durante a etapa de maturação da azeitona a coloração verde é prevalecida sendo as clorofilas as responsáveis, porém no final do período de maturação a concentração deste pigmento é diminuída. Idem ocorre em relação ao processo de

extração do azeite havendo maior degradação parcial das clorofilas e posteriormente dos carotenoides (Gandul Rojas et al., 2010).

A colheita temporã é sempre preferível em relação a colheita tardia, pois a oliveira possuirá maior tempo para se recuperar para a próximo ciclo de produção, havendo também menor quantidade de frutos desprendido da oliveira devido as causas naturais que podem romper a pelicula e facilitar a penetração de fungos e bactérias que provocam degradação da matéria-prima. Normalmente os azeites produzidos de azeitonas em estados de maturação menos avançados são característicos em apresentarem o seu aroma “frutado”, “floral” e complexo, devido aos elevados níveis de fenóis (Costa, 2012).

Jimenez et al. (2014), avaliaram a influência do estado de maturação de duas cultivares de oliveira espanholas, Picudo e Hojiblanca, na azeitona, composição química e propriedades sensoriais dos azeites correspondentes durante três campanhas sucessivas. Os resultados mostraram que a maturação do fruto teve um impacto sobre as propriedades sensoriais dos azeites, definindo as características do produto final, uma vez que irão influenciar a categoria comercial de óleo e o a aceitação pelo consumidor. Em ambas as cultivares e campanhas de produção, os azeites obtidos a partir de azeitonas colhidas em estágio de maturação precoce apresentaram atributos sensoriais positivos superiores. Esse comportamento pode ser explicado pelo teor dos compostos fenólicos que aumenta durante as primeiras fases de maturação do fruto, diminuindo nos estados de maturação mais avançados (Bouaziz et al., 2004; Kalua et al., 2005; Machado et al., 2013; Tovar et al., 2002). Esse decréscimo no teor de compostos fenólicos ao longo da maturação, é devido a diminuição da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, enzima responsável pela sua biossíntese (Machado et al., 2013; Morelló et al., 2005; Tovar et al., 2002).

Ainda neste sentido Gouvinhas et al.(2015), aplicaram técnicas quimiométricas (Análise de Componentes Principais, PCA e Análise de Fator Discriminante, FDA) associadas a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) a fim de diferenciar as diferenças do azeite virgem extra produzido com azeitonas de três cultivares (Cv. Cobrançosa, Galega e Picual) em três diferentes estádios de maturação. Os resultados demonstraram a importância da avaliação do estágio de maturação podendo a técnica aplicada ser útil para os produtores na determinação da fase ideal para a colheita. Além disso,

proporciona a redução da perda de frutos, porém possíveis infecções por fungos relacionados com a colheita tardia.

Durante a colheita as azeitonas podem sofrer alguns danos, devido ao ataque de pragas e doenças como a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Rossi), e a gafa, *Colletotrichum spp.*, respectivamente (Pereira et al., 1999). A intensidade dos estragos causados por *B. oleae* no azeite é o que justifica a aplicação de medidas de luta, como a utilização de pesticidas, o qual é a estratégia mais comum, porém ocasionam impactos negativos sobre o meio ambiente e para a saúde dos consumidores devido a permanência dos resíduos nas azeitonas (Amvrazi & Albanis, 2009).

O armazenamento também pode influenciar as características do azeite, isso porque os frutos podem estar sujeitos à hidrólise espontânea devido à elevação da temperatura, pelo fato de estarem armazenadas em lugares impróprios, como em sacos por exemplo, não havendo quantidade de oxigênio adequada e pelo fruto ser abundante em água, criando condições que favorecem as reações de fermentação. Provocando defeito característico no azeite e aumentando sua acidez comparando com outros azeites que não sofreram uma má colheita (Pereira et al., 1999). A moenda da azeitona é um processo físico utilizado para quebrar os tecidos dos frutos e liberar as gotas de óleo contidas nos vacúolos das células vegetais. A preparação da pasta de azeitona é atualmente realizada em lagares industriais, quer com moinhos de pedra tradicionais operando de forma descontínua ou com triturador tipo martelo. Este último é geralmente utilizado nas indústrias onde a extração do azeite é realizada por centrifugação (Frankel et al., 2013; Servili et al., 2009).

Uma considerável fração de fenóis é retida no azeite durante o processo de extração, enquanto que a outra é eliminada nas águas de vegetação, ou as chamadas águas russas (Nergiz & Ünal, 1991). A diminuição dos compostos fenólicos durante o processo mecânico de extração, ocorre pela solubilização na água que penetra os tecidos, ou mais especificamente por separação das substâncias coloidais, como proteínas e polissacáridos que ligam estes compostos.

O próximo passo do processamento se dá pela batedura que consiste de um amassamento contínuo (20 a 30 rpm) da pasta de azeitona a uma temperatura cuidadosamente monitorada (Clodoveo, 2012). Este processo promove um aumento na percentagem de azeite livre, favorecendo, por um lado a fusão das gotículas de azeite em gotas maiores e por outro, rompendo a emulsão azeite/água facilitando a separação

das fases. O rendimento em azeite e a sua qualidade é grandemente influenciado por essas duas etapas que devem ser devidamente controladas para que se obtenha um produto da máxima qualidade (Duarte, 2011).

Reboredo-Rodríguez et al. (2014), mostraram que é possível modular a fração volátil de azeites de duas cultivares (Morisca, e Manzanilla de Sevilla), de acordo com a temperatura de batadura variando entre 20 e 30° C e acima de tudo pelo tempo de batadura variando desde 30 min até 90 min. Clodoveo (2012), comentam que a eficiência de batadura em manter as características ideais para o azeite depende das características reológicas da pasta de azeitona além dos parâmetros tecnológicos de funcionamento do equipamento, tais como tempo, temperatura e atmosfera do *head space* do tanque de batadura, e eventualmente o emprego coadjuvantes de tecnologia.

Uma maneira de "renovar" a quantidade de compostos fenólicos perdidos durante as etapas do processo, é através da utilização de compostos antioxidantes provenientes de plantas, que são abundantes em compostos fenólicos. Esses fenóis, possuem diferentes efeitos na saúde humana, desde a redução do stress oxidativo, levando à prevenção e proteção contra diversos tipos de cancro, diabetes, doenças coronárias e degenerativas. A utilização de subprodutos das atividades agrícolas é uma das opções, como forma de explorar novas fontes deste tipo de composto, que poderão se tornar rentáveis a extração desses compostos que atuam como antioxidantes naturais. Uma destas fontes poderá ser a folha da oliveira, que é um dos importantes subprodutos, além das águas ruças (Afonso, 2014).

Através dessa eficiente capacidade antioxidante das folhas de oliveira, há uma tendência crescente entre os cientistas de alimentos demonstrar a sua utilização como agente de proteção contra a oxidação de óleos e gorduras (Bouaziz et al., 2008; Farag et al., 2003; Farag et al., 2007; Paiva-Martins et al., 2007; Salta et al., 2007). Em todos os casos que se teve adição de extrato de folhas notou-se uma resistência à oxidação dos óleos e gorduras testados.

As azeitonas sobremaduras, originam azeites menos amargos, menos picantes e mais doces. Devido a diminuição do teor de compostos fenólicos ao longo da maturação, que é explicada pela diminuição da atividade da enzima fenilalanina amónia-liase, enzima responsável pela sua biossíntese (Machado et al., 2013; Morelló et al., 2005; Tovar et al., 2002) .A redução do teor de compostos fenólicos compromete a estabilidade oxidativa dos azeites, consequentemente diminui a vida de prateleira do

produto (Matos et al., 2007). Para melhorar estes aspetos, a utilização de folhas de oliveira é um método com grande atuação, esta capacidade antioxidante advém do fato de serem capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação de lípidos ou outras moléculas oxidáveis, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação (MacDonald et al., 2012; Xu & Howard, 2012).

### **2.2.1. Folhas de oliveira**

Historicamente, as folhas de oliveira já foram utilizadas como medicamento popular para combater algumas doenças, como a malária. Estudos comprovam que o extrato de folha de oliveira tem a capacidade de reduzir a pressão arterial em animais e aumentar o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, para aliviar a arritmia e prevenir espasmos musculares intestinal (Benavente-García et al., 2000). Devido a este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, o qual apresentam a função de reduzir a oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal. Contudo, quando incorporados na alimentação humana, além de conservar a qualidade do alimento, reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e cancro.

As folhas de oliveira são um dos subprodutos de extração de azeite e podem até representar 10% do peso total de azeitonas na chegada ao lagar (Bouaziz et al., 2008). Além disso, as folhas de oliveira são consideradas como uma matéria-prima de baixo custo e que podem ser utilizadas como fonte útil de produtos de alto valor acrescentado (Briante et al., 2002; Roig et al., 2006; Afonso, 2014).

Em relação a sua botânica, as folhas da oliveira são simples, com um pequeno bico terminal e com margem inteira. O limbo apresenta forma coriácea e tem entre 3 a 9 cm de comprimento e a sua largura pode variar entre 1 a 1,8 cm. A face superior da folha possui uma cor verde acinzentada escura, onde as nervuras secundárias são aparentes, enquanto que a face inferior, de cor cinza prateada, é marcada pela presença de pequenos pelos que protegem a árvore da desidratação e, onde a nervura central é muito evidente. O pecíolo é muito curto, atingindo meio cm de comprimento. Cada cultivar possui as suas características relativamente às formas e dimensões das folhas, podendo ser lanceoladas, pequenas, médias, grandes, largas, curtas, estreitas e elípticas (Afonso, 2014), conforme a figura 2.



**Figura 2.** Folhas da oliveira da Cv.Cobrançosa.

A composição química geral da folha da oliveira em relação a matéria orgânica é variável (76,4 a 92,7 g / 100 g de matéria seca), o teor de proteínas em bruto é baixo (6,31 a 10,9 g / 100 g de matéria seca), o teor de aminoácido (89,9 g / 100 g no total azoto) é relativamente importante e o azoto ligado às paredes celulares é elevada, mas variável (49,2 e 35,4 g / 100 g de azoto total). A gordura bruta (2,28-9,57 g / 100 g de matéria seca) também é variável em folhas de oliveira (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

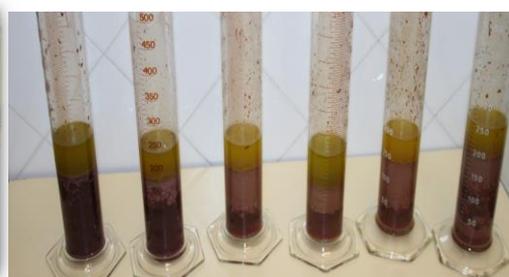
A oleuropeína e os seus derivados, como o hidroxitirosol e ao tirosol são os compostos fenólicos mais abundantes, respetivamente na folha de oliveira. Apresentando uma relação linear entre a quantidade de oleuropeína em folhas e sua propriedade antioxidante ( Farag et al., 2003). A cultivar da oliveira como também o tratamento pós-colheita de folhas são essenciais para a quantidade e qualidade desses diferentes polifenóis em extratos de folhas da oliveira. As folhas são comumente extraídas ou secas antes de serem utilizadas em infusões devido a sua baixa estabilidade química e microbiológica. A infusão causa a destruição de vários polifenóis, porém tem a capacidade de aumentar a concentração de outros compostos fenólicos (Paiva-Martins et al., 2014).

Paiva-Martins et al. (2007), relatou que 1 kg de extrato de folhas é suficiente para fortificar de 50 a 320 litros de azeite refinado, obtendo uma estabilidade semelhante em relação ao um azeite virgem. Isso devido a grande capacidade de proteção através dos compostos fenólicos das folhas de oliveira que atuam contra a oxidação do óleo.

Di Giovacchino et al. (1996), utilizou um sistema de pressão para extração de azeitonas verdes com diferentes percentagens de folhas de oliveira. A utilização dessas folhas não ocasionou nenhum problema mecânico durante o processo de extração. Através das análises habituais do azeite, não observou alteração com adição de folhas, em relação a acidez, índice de peróxido, absorvância e os polifenóis totais. A adição de folhas provocou uma significativa influência na avaliação organoléptica do azeite, prevalecendo com maior intensidade o gosto amargo e o "frutado verde". Isso é ocasionado devido a utilização de frutos verdes que são característicos por apresentarem na sua composição grande teor de oleuropeína, o qual é responsável pelo amargor.

Malheiro et al. (2013), utilizou frutos com alto índice de maturação, o qual normalmente são caracterizadas pela reduzida capacidade de conservação e de qualidade inferior, comparadas com azeites obtidos em tempo de colheita adequada. Adicionou-se diferentes porcentagem de folha de oliveira durante a extração do azeite com o propósito de melhorar as características química e sensorial do azeite a partir desses frutos. Observando um ligeiro aumento em relação a acidez, índice de peróxido, absorvância, porém relatou uma maior resistência oxidativa, devido ao aumento significativo de vitamina E, equivalendo a um acréscimo de 30% com adição de 10% de folhas de oliveira. Um efeito semelhante foi observado nas clorofilas e caretonóides que atribuíam uma maior pigmentação de coloração verde e reforçava atributos nutricionais.

Neste contexto, pretende-se estudar a adição de folhas durante o processo de extração do azeite para melhor efeito benéfico na composição química e na qualidade do azeite.



---

### 3.MATERIAIS E METÓDOS



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Utilização de um desenho fatorial para a avaliação do efeito das condições experimentais sobre a adição de folhas durante o processo de extração.

Com o objetivo de avaliar o efeito da adição de folha de oliveira durante o processo de extração de azeites virgens, e a sua possível influência na composição e qualidade dos azeites extraídos, especialmente antioxidantes, procedeu-se à utilização da ferramenta “metodologia de superfície resposta” com o software MiniTab®.

A metodologia de superfície resposta (Response Surface Methodology - RSM) é uma metodologia utilizada com o objetivo de examinar os efeitos de múltiplos fatores e as suas interações sobre uma ou mais variáveis de resposta. A RSM pode ser utilizada para determinar a combinação dos níveis de fatores que originam a resposta ótima. Sendo o Composto Central “ CCD-Central Composite Design”, a forma mais comum de RSM, sendo amplamente utilizada em estudos de otimização de condições de trabalho como sejam a extração de compostos de interesse (Ballard et al., 2009; Khan et al., 2010).

**Quadro 2.** Condições experimentais, com a conjugação das diferentes variáveis em estudo, nomeadamente percentagem de adição de folha e tempo de batadura, para aplicação da metodologia de superfície de resposta.

RunOrder	PtType	Blocks	Folhas (%)	Tempo (min)
1	0	1	5	30
2	1	1	0	40
3	1	1	10	20
4	1	1	0	20
5	0	1	5	30
6	0	1	5	30
7	-1	1	10	30
8	-1	1	0	30
9	-1	1	5	20
10	1	1	10	40
11	-1	1	5	40
12	0	1	5	30
13	0	1	5	30

Com a utilização desta ferramenta desenvolveu-se um desenho fatorial a 3 níveis (-1, 0 e 1), para cada um dos fatores em análise, nomeadamente a quantidade de folha a adicionar (0%; 5% e 10%) e tempo de batadura (20 min., 30 min., 40 min.). Após corrida do programa, e de acordo com as variáveis em estudo, foram definidas as condições experimentais do quadro 2. Todos os ensaios foram efetuados segundo a

ordem aleatória indicada pelo programa, sendo assim experiências casualizadas independentes. Cada ensaio foi feito em triplicado resultando na obtenção de 39 amostras no total.

### **3.2. Colheita das azeitonas**

As azeitonas utilizadas foram da cultivar Cobrançosa e foram colhidas manualmente e com extrema cautela para evitar qualquer tipo de danos ao fruto, esses frutos foram cultivados em um olival tradicional e em um sistema sequeiro, apresentando índice de maturação 4.

### **3.3. Extração do azeite e preparação dos ensaios de azeite**

A extração dos azeites decorreu nas primeiras 24 h após colheita dos frutos. A extração foi feita num sistema de extração Abencor (Commercial Abengoa SA, Sevilha, Espanha) apresentado na figura 3a. Este tipo de equipamento simula todo o processo de obtenção de azeite de uma linha industrial. Procedendo-se à moenda das azeitonas, batedura e centrifugação das pastas e separação das diferentes fases, sólido-líquido e líquido-líquido.

Para cada lote pesaram-se 1,0 Kg de azeitonas que foram colocadas num moinho para triturar a polpa e o caroço da azeitona e formar uma pasta, figura 3b. Nos ensaios em que foi necessária a adição de folhas, essas eram previamente trituradas numa trituradora de facas Moulinex, após o que era pesada a massa necessária de folhas e moídas sendo adicionadas aos frutos antes da moenda, impregnado desta forma as folhas com a pasta dos frutos, figura 3c. Após a moenda, procedeu-se à homogeneização da pasta com uma espátula. Da pasta obtida na moenda, foram pesados 700g para os copos do sistema Abencor. Para facilitar a extração a cada copo foram adicionados 20g de talco. Segundo Peres et al. 2012, as enzimas endógenas facilitam a degradação das paredes celulares das azeitonas que são constituídas essencialmente por enzimas celulolíticas. Durante o processo de extração, algumas das enzimas presente nas azeitonas, são inativadas. Com isso, adjuvantes de extração, no caso, o talco, são utilizados para melhorar a extrabilidade das pastas.

Posteriormente, os copos com a pasta foram submetidos a um processo de batedura que ocorreu à temperatura do banho-maria de 25°C, figura 3d. O tempo de batedura, e à semelhança da quantidade de adição de folhas, obedeceu ao desenho fatorial previamente estabelecido pelo software MiniTab®. Por forma a separar melhor

o azeite da pasta de azeitona, 5 minutos antes do fim da batidura foram adicionado 100mL de água a temperatura de 35°C. Após finalizada a batidura, a pasta foi centrifugada permitindo separar a fase líquida da fase sólida por diferença de densidades, figura 3e. Em seguida, pelo processo de decantação, ocorreu a separação das fases líquidas, o azeite, na parte superior, das águas ruças, na parte inferior, figura 3f. Os azeites obtidos em cada uma das extrações foram colocados em garrafas individuais. Após a primeira corrida das 13 combinações, seguindo a ordem estabelecida no quadro 2, procedeu-se a mais duas repetições, com a mesma ordem, totalizando 39 azeites extraídos. Uma representação esquemática do processo de extração pode ser observada na figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática das diferentes fases do processo de extração usando uma linha do tipo Abencor. a) Sistema de extração tipo Abencor b). Moinho para triturar polpa e caroço da azeitona c) Moenda da pasta da azeitona com adição de

folhas d) Processo de batidura a 25 °C e) Processo de centrifugação f) Processo de decantação.

Antes de proceder às diferentes determinações nos azeites extraídos, procedeu-se à preparação das amostras fazendo passar o azeite por papel de filtro Whatman n°4, na presença de sulfato de sódio anidro, removendo desta forma possíveis impurezas e humidade que pudessem estar presentes. Após filtração as amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente em garrafas de cor âmbar e no escuro, de modo a diminuir a ocorrência de fenómenos oxidativos. As análises efetuadas ocorreram no menor período de tempo possível após obtenção dos azeites. Para cada azeite, e cada determinação, as análises foram feitas em duplicata.

### **3.4. Parâmetros avaliados nas amostras de azeite obtidas**

Nos azeites extraídos procedeu-se à determinação de um conjunto de parâmetros quer para avaliar a sua qualidade, como sejam a acidez, o índice de peróxido, a análise espectrofotométrica no ultravioleta e a análise sensorial. Avaliar a sua composição, o perfil em ácidos gordos, e teor em tocoferóis e tocotrienóis; clorofilas e carotenoides e perfil em compostos voláteis; e determinar a sua atividade antioxidante através da avaliação do teor em fenóis totais, resistência à oxidação pelo método Rancimat, Efeito bloqueador de radicais de DPPH e atividade sequestradora de radicais ABTS.

#### **3.4.1. Parâmetros de qualidade**

##### **3.4.1.1. Acidez**

A determinação da acidez foi realizada de acordo através da metodologia oficial descrita no anexo II do Regulamento (CEE) n° 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, da seguinte forma: pesaram-se aproximadamente, 3,0g de azeite para um matraz, independentemente da acidez presumida, que foram dissolvidas numa solução (1:1) etanol/éter etílico e tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína, até aparecimento de cor rosada ténue e persistente. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. A acidez, expressa em percentagem de ácido oleico livre na amostra, foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

Onde:

V - Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

C - Concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro;

M - Massa molar do ácido oleico em g/mol;

m - Massa da amostra em grama.

### 3.4.1.2. Índice de peróxido

A determinação do índice de peróxido foi realizada de acordo com o método oficial descrito no anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, com a seguinte metodologia: cada toma de amostra, de aproximadamente 1,2 g, foi dissolvida em ácido acético glacial (15 mL) e clorofórmio (10 mL), com uma solução de iodeto de potássio (1 mL). Após dissolução dos reagentes, tapou-se o matraz, e armazenou-se durante 5 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por último, acrescentaram-se 75 mL de água destilada, uma solução de amido (1g/100mL) como indicador e titulou-se o iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01N. Cada amostra foi analisada em duplicado e foi realizado um ensaio em branco. Os peróxidos são os primeiros compostos formados quando ocorre a deterioração de uma gordura, com isso, toda gordura oxidada apresenta valores positivos para o ensaio de peróxidos (Cecchi et al., 2010). Os valores de índice de peróxido foram determinados utilizando a seguinte equação:

$$\text{Índice de Peróxido} \left( \text{mEq.} \frac{\text{O}_2}{\text{kg}} \right) = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

Onde:

V - Volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação, tendo em conta o ensaio do branco;

N - Normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio;

m - Massa da amostra em grama.

### 3.4.1.3. Espectrofotometria no ultravioleta

A análise da absorvância no ultravioleta foi efetuada com método oficial descrito no anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, com a seguinte metodologia: em aproximadamente 0,6 g da amostra foram dissolvidas em 10 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) no seu estado puro, em seguida a amostra dissolvida são colocadas em “cuvettes” de quartzo de percurso ótico de 1cm, o coeficiente de extinção da solução nos comprimentos de onda prescritos (232 a 276nm). As leituras de absorvância foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ 10. Os coeficientes de extinção a 232 nm, 270 nm e  $\Delta K$  foram determinados utilizando a seguinte equação:

$$K_{232} = \frac{A_{232}}{c \times l}$$

$$K_{270} = \frac{A_{270}}{c \times l}$$

$$\Delta K = K_{270} \frac{A_{266} + A_{274}}{2}$$

Onde:

$A_{232}$ ,  $A_{266}$ ,  $A_{270}$  e  $A_{274}$  são absorvâncias nos comprimentos de onda indicados nos sub índices;

c - concentração do azeite em g / 100 mL;

l - percurso ótico (1 cm).

### 3.4.1.4. Avaliação sensorial

A avaliação sensorial foi baseada no julgamento de um painel de avaliadores, guiada por um líder do painel de prova, que possui conhecimento e habilidades suficientes para preparar as sessões de análise sensorial, motivar julgamento, dados do processo, interpretar os resultados e elaborar o relatório. Esses avaliadores foram treinados para adquirirem a capacidade de identificar e medir a intensidade das diferentes sensações percebidas positivos e negativos.

Cada amostra foi avaliada por provadores treinados para o efeito, sendo os azeites classificados de acordo com 14 descritores organoléticos, entre elas cinco sensações olfativas (frutado, outros frutos, verdes, sensações positivas e harmonia) sete sensações gustativas-retronasal (frutado, doce, amargo, picante, verde, sensações positivas e harmonia) e duas finais olfacto-gustativas (complexidade e persistência)

Regras codificadas são estabelecidas para a avaliação sensorial. A avaliação foi realizada em uma sala de degustação específica, usando condições controladas para minimizar as influências externas, utilizando um vocabulário específico e uma folha de perfil que inclui atributos sensoriais positivo e negativo.

A coleção dos resultados e elaboração estatística foi normalizada conforme o Regulamento (CEE) nº 2568/91 e e posteriores alterações. A cor do azeite, não está significativamente relacionada com a sua qualidade, com isso, esse parâmetro pode produzir expectativas e interferências no sabor. Portanto, o provador utilizou-se de um copo de coloração azul ou cor de âmbar, durante a prova de azeite para não haver influencia pela tonalidade do produto. Segundo o Regulamento 640/08, as avaliações olfativas e gustativas, pode classificar o azeite em categorias de qualidade diferentes (virgem extra, virgem e lampante). Cada atributo foi calculado, e o valor médio de cada um é usado para classificar o azeite de acordo com a mediana do defeito percebido com maior intensidade e da mediana do "frutado". Vale ressaltar, que o valor do coeficiente de variação robusto para este atributo negativo deve ser superior a 20%.

A folha de perfil oficial utilizada pelos provadores, constituída por uma secção superior para a avaliação da intensidade de defeitos, e uma parte inferior para a avaliação dos três atributos sensoriais positivos mais importantes: frutado, amargo e picante. O ideal é o azeite estar a uma temperatura de 28 °C, pois a nessa temperatura há maior libertação dos componentes que conferem aroma e sabor, posteriormente o provador através do olfacto avaliou o azeite e através do paladar avaliou a intensidade de cada um dos atributos positivos e negativos sobre uma a escala de 10 cm.

### **3.5. Composição**

#### **3.5.1. Composição em ácidos gordos**

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) no 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. Cada

amostra foi analisada em triplicado. Como os ésteres metílicos, os ácidos gordos foram avaliados através da transesterificação direta a frio. A toma de duas gotas de amostra foi dissolvida em 2 mL de n-heptano, 100 µL de padrão interno hidrogenofosfato de sódio, 200 µL de hidróxido de potássio preparado em metanol e fosfato de sódio.

A separação dos ácidos gordos foi efetuada em um cromatógrafo gasoso (GC) Chrompack, modelo CP-9001, numa coluna WCOT (Wall Coated Open amostrador Tubular) de sílica fundida com fase estacionária CP Sil-88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25 30 mm x 0,19 µm. Foi utilizado hélio como gás de arrasto. A pressão interna era de 140 kPa. As temperaturas do injetor, da coluna e do detetor eram 120 °C a 220 °C, respetivamente, com uma relação de split de 1:50 e um volume de injeção de 1 µL. A recolha e o tratamento dos dados foram realizados pelo programa CP Maitre Chromatography Data System, Version 2.5 (Chrompack International B.V.).

Os resultados são expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico e eluído entre os ésteres mirístico, linocérico e metílico. Uma amostra controle (Olive oil 47118, Supelco) e uma mistura padrão de éster metílico de ácido gordo (Supelco 37 FAME Mix) foram utilizados para identificação e calibração (Sigma-Aldrich®, Espanha).

### **3.5.2. Composição em tocoferóis**

O teor de tocoferóis foi determinado através de um cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), segundo a norma ISO 9936:2006, com algumas modificações descrita por Alves et al., (2010), obtendo assim a concentração de vitamina E.

Pesaram-se aproximadamente 100 mg de amostra, adicionou-se 10 µL de 2-Metil-2- (1 mg/ml em hexano) -croman-6-ol (tocol) (Matreya Inc., USA) e completou o volume até 1 mL com n-hexano. O padrão de tocoferóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -) foi adquirido de Supelco (USA).

O cromatógrafo é formado por um sistema integrado Jasco (Japão) juntamente com uma bomba modelo Jasco PU-1580 (Japão), amostrador automático refrigerado (Jasco AS-2057 Plus, Japão), degaseificador Jasco DG-2080-53 (Japão), e um detector de Fluorescência (Jasco FP-2020 Plus, Japão), o qual é programado para ser excitado a 290 nm e emitir a 330 nm.

A separação cromatográfica foi obtida por uma coluna Supelcosil™ (LC-SI; 75 cm × 3,0 mm; 3 µm) (Sigma-Aldrich, Alemanha), operando à temperatura constante de 22 ± 2°C. O sistema isocrático era composto por uma fase móvel, com uma mistura de 1,4-dioxano em n-hexano (2,5%, v/v) num caudal de 0,70 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 20 µL. Posteriormente os dados foram analisados com o controle ChromNAV Center, Jasco Chromatography Data Station (Japão), e os resultados expressos em mg.Kg<sup>-1</sup> de azeite.

### 3.5.3. Perfil de compostos voláteis

O perfil em compostos voláteis foi avaliado nas diferentes amostras de azeites da Cv. Cobrançosa com diferentes percentagens de folha de oliveira e tempos de extração por HS-SPME (microextração da fase sólida pelo espaço de cabeça) e GC-MS (cromatografia líquida com detetor de massas).

Os compostos voláteis foram extraídos do espaço de cabeça de vials de 50 mL contendo aproximadamente 3 g de azeite às quais foram adicionados 10 µL de padrão interno (4-metil-2-pentanol a 100 ppm) com uma fibra de SPME cotada com divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 50/30 µm) (Supelco, Bellefonte, EUA). Em cada amostra os voláteis foram libertados para o espaço de cabeça durante 5 minutos a 50 °C sendo posteriormente absorvidos pela fibra de SPME durante 30 minutos à mesma temperatura. Após a extração a fibra de SPME foi recolhida e inserida no injetor de um sistema de cromatografia líquida. O procedimento de HS-SPME foi realizado em triplicado para cada amostra em estudo. O mesmo procedimento foi efetuado num ensaio sem azeite (branco).

Os compostos retidos na fibra de SPME foram eluídos por adsorção térmica durante 1 minuto. Para limpeza e acondicionamento da fibra de SPME para futuras determinações, a fibra foi mantida no injetor do cromatógrafo durante 10 minutos a 220 °C. A deteção e quantificação dos compostos voláteis foram feitas num cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 Plus equipado com um detetor de massas Shimadzu GC/MS-QP2010 SE. Uma coluna TRB-5MS (30 m × 0.25mm × 0.25µm) (Teknokroma, Spain) foi usada. O injetor foi programado para 220 °C e as injeções manuais foram feitas no modo de splitless. A fase móvel usada foi hélio (Praxair, Portugal) a uma velocidade linear de 30 cm/s e um fluxo total de 24,4 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi fixada a 40 °C durante o primeiro minuto, com um aumento posterior de 2 °C por

minuto até aos 220 °C, e mantida a esta temperatura durante 30 minutos. A fonte de ionização foi mantida a 250 °C com uma energia de ionização de 70 V e uma corrente de ionização de 0.1 kV. Todos os espectros de massa foram adquiridos por ionização eletrónica. A ionização foi desligada durante os três primeiros minutos de cada corrida cromatográfica. Os espectros de massa foram comparados com compostos padrão e com os obtidos na base de dados (NIST 11). Os compostos identificados foram quantificados através da integração dos seus cromatogramas reconstruídos a partir do cromatograma full scan usando o íon de base de cada composto ( $m/z$  100% de intensidade). A quantificação foi feita através da razão da área de cada composto com a área do padrão interno e convertida em equivalentes massa de acordo com a massa de padrão interno adicionado.

### **3.6. Atividade antioxidante**

#### **3.6.1. Determinação do teor em fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol totais**

Pesou 0,4 g de azeite foi dissolvida em 2,0  $\mu\text{L}$  de padrão interno (ácido siríngico) a 0,15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 2,5 mL de ácido clorídrico 2M, preparado em uma mistura de metanol/água (80:20 v/v).

A mistura formada foi mantida em temperatura estável de (25°C) durante 6 horas, sofrendo agitação em vortex de 30 em 30 minutos durante 30 segundos. Posteriormente foi adicionado 2,5 mL de uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v). O extrato hidrolisado formado foi filtrado em uma membrana filtrante descartável de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  (Tecnocroma, Espanha).

Os hidrolisados foram conservados à 4°C até a sua análise por HPLC. O HPLC aplicado foi da marca JASCO (Japão), constituído por bombas PU-4180 Plus, um injetor automático do modelo AS 4050 com um volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Utilizou-se uma coluna de fase reversa da Phenomenex (Kinetex ® C18 2.6  $\mu\text{m}$  100 Å, 150 x 3,00 mm), mantido a 25 °C num forno de coluna, modelo ECO2080 da ECOM (República Checa).

Um detector de díodos MD-4010 foi acoplado ao cromatógrafo. A aquisição e tratamentos de dados foram adquiridos por ChromNAV Data System. Para a separação de fase cromatográfica, uma solução aquosa foi utilizada, 0,2% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (eluyente A) e

0,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em metanol/acetonitrila (50:50 v/v) (eluente B), os gradientes apresentam-se no quadro 3.

**Quadro 3.** Gradientes utilizados para determinar os componentes hidroxitirosol e tirosol (mg/kg) dos azeites com diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura.

Tempo (min)	% de Eluente A	% de Eluente B
0	96	4
5	85	15
14	75	25
18	73	27
33	63	37
43	45	55
50	0	100
55	0	100
57	96	4
75	96	4

### 3.6.2. Estabilidade oxidativa pelo método Rancimat

A estabilidade à oxidação foi estimada medindo a tempo de indução através do método de condutividade (Rancimat 743, Methrom Ltd., Suíça). É um processo o qual o fluxo de ar passa através do óleo. Consiste em fazer borbulhar uma corrente de ar, filtrada, limpa e seca (20 L.h<sup>-1</sup>) através de uma quantidade de amostra (3,0 g) aquecida a 120 ± 1,6°C. Com o passar do tempo, são formados compostos de oxidação mais polares, como os triglicerídeos entre eles os hidroperóxidos, álcoois e compostos carbonílicos, são arrastados pelo fluxo de ar e borbulham em seguida numa solução aquosa. Nesta solução é necessário está imerso um elétrodo que mede a sua condutividade. O equipamento é capaz de efetuar análises automaticamente e em contínuo, a operação é interrompida quando a condutividade medida atinge o seu máximo de (300µS/cm).

Um programa informático é acoplado no aparelho, informando o cálculo dos tempos de estabilidade oxidativa, através do traçado das tangentes à curva obtida. Obtendo-se o “período de indução”, que é o intervalo de tempo entre o início do registo e o ponto de interceção das tangentes à curva.

### 3.6.3. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•)

A estimativa da atividade sequestradora realizada pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hatano et al.,

(1988). O DPPH• na terminologia IUPAC para o composto químico di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium, é um radical livre estável que aceita um eletrão ou um radical de hidrogénio para se tornar uma molécula diamagnética estável e portanto, reduz a velocidade de uma reação química.

Para a avaliação da atividade antioxidante diferentes concentrações de amostras de extratos foi realizado em conformidade descrito por Kalantzakis et al, (2012). O azeite foi diluído em acetato de etilo (100 ml/ml de acetato de etilo), foi misturado com o DPPH, em uma concentração de 1,104 mol/L em acetato de etilo. As amostras foram homogeneizadas e permaneceram no escuro durante 30 minutos. Após isso foi realizada a leitura em 515 nm.

#### **3.6.4. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS•+)**

A formação do radical ABTS [2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ] é um dos métodos espectrofotométricos que está sendo cada vez mais aplicado para a medição da atividade antioxidante total das soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. Além disso, este método aceita medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

Descrito por Re et al. (1999), o seguinte método foi descrito em relação a capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS (ABTS•+) A reação química do ABTS•+ com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), permite a formação dos radicais ABTS.

Assim, para esta técnica, o ABTS•+ (7mM) foi enriquecido com  $K_2S_2O_8$  (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas. A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma absorvância a  $\lambda = 734$  nm de  $0,70 \pm 0,02$ . A reação realizou-se diretamente na cuvete de quartzo, com a adição de 2 mL de ABTS•+ (Branco) e de 100  $\mu$ L de amostra ou padrão. Os valores de absorvância são inversamente proporcionais à quantidade de antioxidantes presentes nas nossas amostras. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™.

#### **3.7 .Determinação da cor**

A determinação da cor dos azeites foi mensurada com um colorímetro Konica Minolta model CR-400. Os resultados obtidos foram expressados nos modos CIELAB e Hunter que são um dos sistemas de cor mais utilizados para a avaliação deste parâmetro

em alimentos, tendo sido avaliadas as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (CIELAB) e  $L$ ,  $a$  e  $b$  (Hunter). O  $L^*$  ou  $L$  corresponde à luminosidade, o  $a^*$  ou  $a$  ao conteúdo de vermelho a verde, e o  $b^*$  e  $b$  ao conteúdo de amarelo a azul.

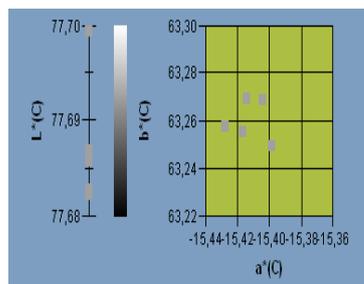
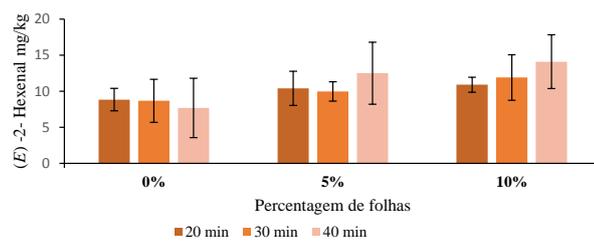
Para determinar a cor dos azeites utilizou-se implementos específico para amostras líquidas, tendo-se imergido o adaptador na amostra com isso determinar a sua cor. Previamente calibrou-se o aparelho através de um padrão branco de referência. O procedimento foi realizado para todas as amostras, repetidas em quintuplicata cada amostra.

### **3.8. Análise estatística**

#### **3.8.1. Análise de variância**

A análise de variância dos parâmetros avaliados para os compostos voláteis foi analisada pelo modelo linear geral software SPSS, versão 19,0 (IBM Corporation, New York, EUA). O cumprimento dos requisitos da ANOVA, nomeadamente a distribuição normal dos resíduos e a homogeneidade de variâncias, foram avaliados por meio de testes Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors (se  $n > 50$ ) ou testes Shapiro-Wilk (se  $n < 50$ ), e os testes de Levene, respectivamente. Todas as variáveis dependentes foram analisadas usando uma ANOVA one-way com ou sem correção de Welch, dependendo se o requisito da homogeneidade de variâncias foi cumprido ou não. O principal fator estudado foi o efeito da percentagem de folhas e tempo de batedura adicionado durante a extração Cv.Cobrançosa, sobre a composição volátil Se os efeitos da adição de folhas foram significativos para os parâmetros de qualidade, as médias são comparadas pelo teste de Tukey, pois variâncias iguais poderiam ser assumidas. Se os efeitos das folhas foram significativos para os parâmetros estudados, as médias são comparadas pelo teste de Dunnett T3, pois variâncias iguais não poderiam ser assumidas. Todos os testes estatísticos foram realizados em um nível de significância de 5%.





#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O presente trabalho teve por objetivo principal estudar o efeito da adição de diferentes percentagens de folhas de oliveira durante o processo de extração do azeite, conjugado com diferentes tempos de batadura da pasta, usando para tal um desenho fatorial para cada um dos fatores usando a ferramenta de “metodologia de superfície resposta” com o software MiniTab®. Para melhor compreensão dos resultados obtidos, estes serão apresentados de acordo com as variáveis em estudo, para cada um dos parâmetros avaliados.

### **4.1. Parâmetros de Qualidade**

Os valores médios provenientes das determinações efetuadas para acidez, índice de peróxido e espectroscopia no ultravioleta dos ensaios da Cv. Cobrançosa com adição de diferentes percentagens de folhas de oliveira e tempo de batadura, encontram-se presentes no quadro 4.

A acidez é um dos parâmetros que estão relacionados com a qualidade dos óleos como também de gorduras vegetais, e é indicador de degradação hidrolítica. No azeite, indica a quantidade de ácidos gordos livres, expressa em gramas de ácido oleico, por 100 gramas de azeite.

A acidez nas amostras avaliadas, tendo em atenção os diferentes eventos em análise, apresentou valores muito baixos, a variar entre 0,2% e 0,3% (Quadro 4), o que por si pode ser indicativo da elevada qualidade dos azeites extraídos. Tendo em conta apenas este parâmetro, todos os azeites poderiam ser classificados na categoria comercial de azeite virgem extra, em que o valor máximo permitido para a acidez é de 0,8%, segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 e suas alterações posteriores.

De uma maneira geral, quanto maior for o valor de acidez, menor será a qualidade do azeite. Contudo, este parâmetro terá que ser avaliado em conjugação com os restantes parâmetros de qualidade, principalmente a avaliação sensorial, uma vez que valores baixos de acidez não são suficientes para que os azeites possam ser bem classificados sensorialmente. As reações químicas de hidrólise originam os ácidos gordos livres, que se potencializam devido a contribuição de alguns fatores, como: ataque de pragas e doenças, imprudência durante as etapas de processo de colheita, transporte, armazenamento e extração.

**Quadro 4.** Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O<sub>2</sub>/Kg); K<sub>232</sub>; K<sub>270</sub> e ΔK] do azeite extraído com diferentes percentagens de folha e tempo de batedura das pastas (média ± desvio padrão).

<b>Ensaio</b>	<b>Folhas (%)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Acidez (% ácido oleico)</b>	<b>IP (mEq.O<sub>2</sub>/Kg)</b>	<b>K<sub>232</sub></b>	<b>K<sub>270</sub></b>	<b>ΔK</b>
1	5	30	0,3±0,00	4,15±1,65	2,92±0,23	0,24±0,05	0,004±0,00
2	0	40	0,3±0,00	3,46±0,97	3,60±0,46	0,29±0,04	-0,003±0,00
3	10	20	0,3±0,00	4,15±1,39	1,26±0,15	0,17±0,02	-0,002±0,00
4	0	20	0,3±0,05	2,90±0,45	1,41±0,15	0,17±0,01	0,000±0,00
5	5	30	0,2±0,05	4,43±0,85	1,76±0,26	0,21±0,02	0,002±0,01
6	5	30	0,3±0,00	4,42±1,70	1,72±0,16	0,22±0,02	-0,002±0,00
7	10	30	0,3±0,05	4,15±1,66	1,82±0,13	0,30±0,06	0,004±0,00
8	0	30	0,2±0,05	2,62±0,81	1,85±0,19	0,27±0,05	0,002±0,00
9	5	20	0,3±0,05	3,46±0,63	1,87±0,25	0,27±0,05	-0,001±0,00
10	10	40	0,3±0,00	2,77±0,68	1,93±0,09	0,32±0,05	-0,004±0,00
11	5	40	0,3±0,05	3,32±0,00	1,95±0,14	0,28±0,02	0,000±0,00
12	5	30	0,3±0,00	3,32±0,52	1,63±0,23	0,17±0,02	-0,008±0,02
13	5	30	0,3±0,00	3,04±0,43	1,90±0,15	0,18±0,02	-0,002±0,00

Reboredo-Rodríguez et al. (2014) e Ben Mansour et al. (2015), observaram aumento na acidez em função com o índice de maturação e como aumento no tempo de batadura. Nesse sentido os valores obtidos não surpreendem, visto as azeitonas terem sido selecionadas, em que os frutos não se encontravam danificados, diminuindo então a atuação das lipases, que são enzimas presentes no fruto e que hidrolizam as ligações éster-carboxilato de acilgliceróis produzindo ácidos gordos livres, além disso, foram transportadas em caixas rígidas, para evitar o seu esmagamento e início de possíveis deteriorações, e foram laborados em menos de 24 horas após a colheita, o que também reduziu a existência de processos degradativos.

Os resultados para o índice de peróxidos apresentaram variação entre 2,62 e 4,43 mEq. O<sub>2</sub>/kg (Quadro 4), sendo estes valores muito baixos e que permitem a classificação de todos os azeites na categoria de azeite virgem extra, segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 e alterações posteriores, cujo valor máximo permitido é de 20mEq. O<sub>2</sub>/kg. Contudo, parece haver um efeito negativo da adição de folhas neste parâmetro, uma vez que os valores são superiores em percentagens intermediárias e extremas.

Tal fato, poderá ser devido à presença das folhas e também ao elevado tempo de batadura que contribui para a incorporação de oxigênio e alteração de gases referentes ao processo de respiração, aumentando a disponibilidade de oxigênio, favorecendo o processo de peroxidação. Estudos de Bacelar et al. (2006), revelam que a Cv. Cobrançosa possui maior resistência a peroxidação em condições de baixa disponibilidade de água comparando com as cultivares Madural e Verdeal Transmontana. Porém, esse déficit hídrico para a oliveira, proporciona estresse oxidativo nas folhas e aumenta o nível de peroxidação lipídica, apesar do trabalho referido ser avaliado em condições de campo, é possível que os resultados obtidos possam ser extrapolados para a extração de azeite.

Além disso, existe um elevado teor de clorofila presente nas folhas, esses pigmentos atuam como fotossensibilizadores, devido a transformação de oxigênio tripleto por oxigênio singleto, o qual é mais reativo e menos estável, então reagem com os ácidos gordos insaturados e resultam na formação de hidropéroxidos (Psomiadou & Tsimidou, 2002).

A determinação do índice de peróxidos é um indicador muito sensível da oxidação primária dos lípidos. Estes peróxidos instáveis decompõem rapidamente em produtos de

oxidação secundários, em particular aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos, dímeros, trímeros, polímeros e compostos cíclicos (Tan et al., 2001). Quanto maior os valores de índice de peróxido, maior é o valor da reação de oxidação e conseqüentemente pior é a qualidade da gordura em análise.

Através dos coeficientes de extinção específica ( $K_{232}$  e  $K_{270}$ ), tem-se noção do grau de oxidação do azeite, completando as verificadas no parâmetro índice de peróxido. No azeite, têm importância os índices derivados da análise espectrofotométrica  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  e  $\Delta K$ . Os valores obtidos para os coeficientes de extinção específica  $K_{232}$  e  $K_{270}$  encontram-se apresentados no quadro 4.

A adição de folhas e os diferentes tempos de bataduras influenciaram nos valores desses coeficientes de extinção específica. Para  $K_{232}$ , os valores variaram de  $1,26 \pm 0,15$  a  $3,60 \pm 0,46$ . Observou-se o valor mais baixo para o evento que apresentava 10% de folhas e o menor tempo de batadura.

Porém o valor mais elevado registou-se para os azeites extraídos de azeitonas onde não foi adicionada nenhuma quantidade de folhas (0%) e com maior tempo de batadura, nessas condições, o que pode ser indicativo que um elevado tempo de batadura terá implicações negativas neste parâmetro. De acordo com Reboredo-Rodríguez et al. (2014), o aumento dos valores resultantes deste parâmetro tem relação com a oxidação primária. Desta é possível inferir que nestas condições (0% de adição de folhas e tempos de batadura elevados) o processo de oxidação primária se dá com maior facilidade.

Para o  $K_{270}$ , houve uma variação entre  $0,17 \pm 0,02$  e  $0,32 \pm 0,05$ , o valor mais elevado foi observado para a maior quantidade de folhas e tempo de batadura. Podendo estar relacionado com o alto teor de clorofilas presentes nas folhas, o qual atuam como pró oxidantes na presença de luz, isto é, iniciam a oxidação do azeite devido a conversão oxigênio tripleto no estado fundamental para o oxigênio singleto altamente reativo (Küpper et al., 2002), podendo ocasionar um aumento dos valores dos coeficientes de extinção específica. Ainda de acordo com Reboredo-Rodríguez et al. (2014), o aumento do resultado do parâmetro  $K_{270}$  está relacionado com a oxidação secundária e aumento de produtos carboxilados produzidos durante o processo de oxidação. Possivelmente o mecanismo de pró oxidação envolvido com as clorofilas provenientes das folhas se dá por este processo.

Os valores de  $\Delta K$ , mantiveram-se praticamente constantes para todas as condições de percentagem de folhas e tempo de batedura. Os resultados obtidos estão abaixo do máximo admissível para as categorias de azeite virgem extra e azeite virgem, cujos valores máximos permitidos são  $\leq 0,01$  segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 e suas posteriores alterações, os valores máximos permitidos são  $\leq 0,01$  segundo o Regulamento (CEE) n° 2568/91 e suas posteriores alterações.

## **4.2. Análise Sensorial**

Os resultados obtidos mostram que os azeites avaliados podem ser classificados como azeites virgem extra pois conforme o Regulamento (CEE) n° 2568/91 e alterações posteriores, não apresentando nenhum tipo de defeito e apresenta mediana do frutado maior que zero (0), sendo os resultados apresentados no quadro 5.

Em relação as sensações olfativas, a presença das folhas influenciou suavemente a sensação de frutado, esse atributo positivo está normalmente relacionado com a utilização de azeitonas frescas, sadias e maduras, o qual é percebido diretamente com o aroma do azeite, podendo a adição de folhas conferir características semelhantes. Essa sensação é influenciada pelo grau de maturação do fruto. Também Di Giovacchino et al. (1996), chegaram a conclusões semelhantes nos seus trabalhos, observando o aumento na intensidade do "frutado verde" e "gosto amargo" no azeite quando extraído com a adição de folhas de oliveira. Através da figura 4, para a representação gráfica do frutado, os maiores valores estão em posição intermédia tanto de percentagem de folhas como de tempo de batedura. Contudo, é de referir que são exatamente para essas condições que se encontram os piores valores de análise sensorial de azeites.

A nota outros frutos, pode estar relacionada com a sensação do aroma de frutos, como amêndoa, nozes, maçã, banana, abacaxi, entre outros, que são influenciados essencialmente pela cultivar de origem das azeitonas e perceptíveis apenas para as sensações olfativas (Tura et al., 2008) tendo sido influenciadas pelos baixos tempo de batedura.

A sensação olfativa de verde, é uma das notas de maior interesse no estudo, pelo fato da adição de folhas serem ricas em pigmentos, juntamente com tempos de bateduras diferentes, é expectável que o maior tempo de contato durante a batedura entre as folhas e o azeite conjugado com maiores tempos de batedura proporcionem um aumento neste parâmetro.

Através da figura 4, observa-se que com a adição de folhas, a maioria dos azeites melhoraram essa nota, apenas para os ensaios 7 e 8, o qual apresentam 0% e 10% de percentagem de folhas, com o mesmo tempo de batadura (30 minutos) tal não se verificou. Com isso, nessas condições pode observar que o equilíbrio desses parâmetros pode influenciar essas notas. Em relação as outras sensações positivas, observou-se através do quadro 5, que os melhores valores estão para condições intermediárias de folhas e tempo de batadura.

A nota harmonia, está relacionada com o equilíbrio das notas sensoriais olfativas (Civille & Oftedal, 2012), nota-se que tanto a adição de folhas como o tempo de batadura, influencia essa sensação. Observa-se que o tempo de batadura em 30 min, pode influenciar tanto positivamente como negativamente essa nota, conforme a figura 4, em 0% e 5% apresenta valores baixos, porém quando adicionado 10% de folhas, faz com que melhore essa nota.

Em relação a sensorial gustativa-retronasal, observa-se que apresenta menos equilíbrio em relação as condições de 5% ou 10% de folhas e tempo de batadura em relação a olfativa. Os melhores valores para essa nota foram obtidos no ensaio 1, 2, 6 e 10 e os menores 1 e 8.

Para as sensações doces e outras sensações positivas, observa-se um equilíbrio entre as condições. A sensação doce é influenciada pelo tempo de maturação do fruto, quanto maior esse período mais perceptível é essa nota, além disso, essa sensação consegue mascarar o amargo e o picante, porém não eficientemente nesse caso devido a adição de folhas o qual apresentam compostos fenólicos que são característicos pelo amargor.

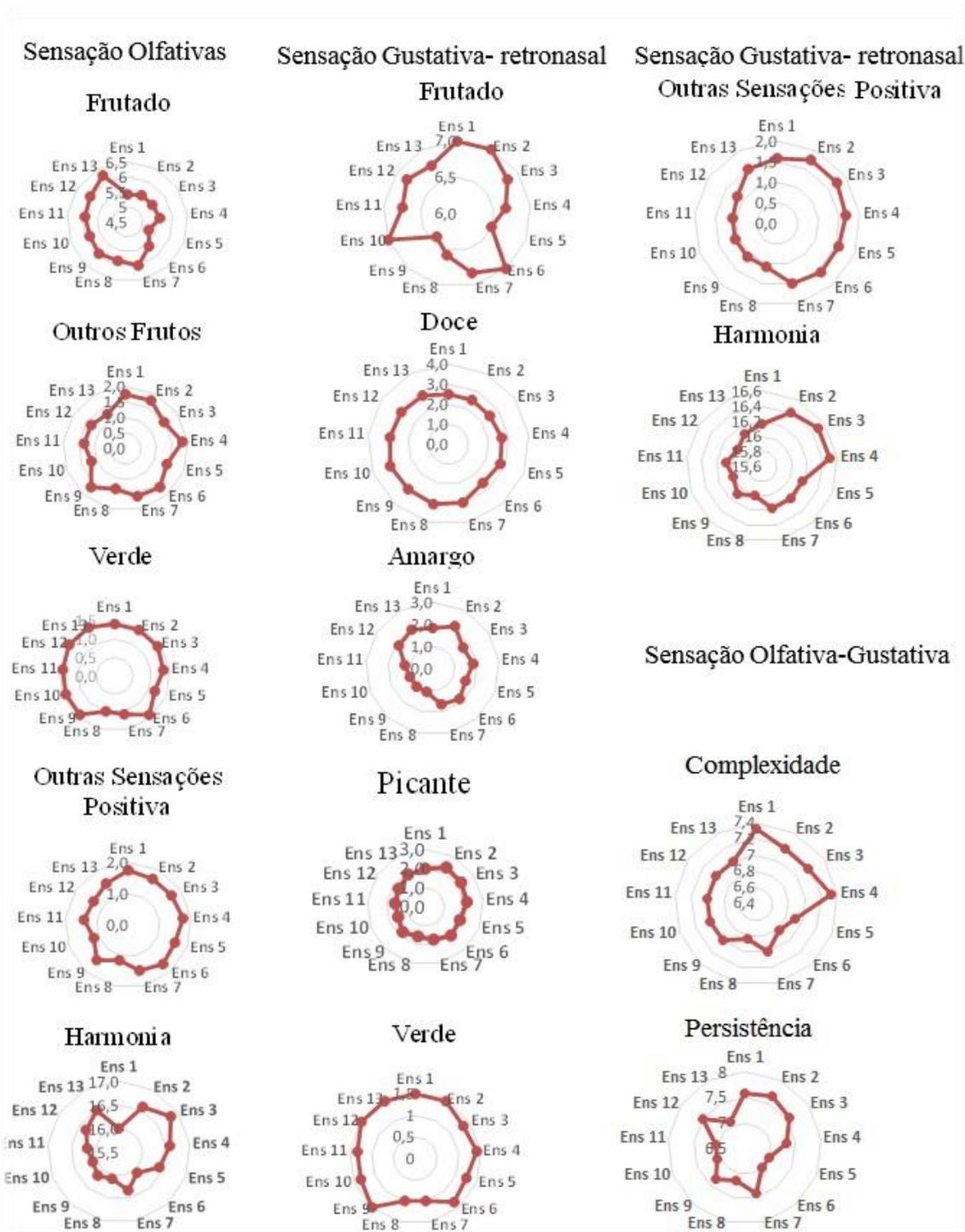
O picante teve grande influência em relação a adição de folhas e tempo de batadura, nota-se que em todas as condições obteve-se valores intermediários para essa nota.

Como para a sensação olfativa, a sensação verde apresentou-se idêntica, quando comparadas com a sensação gustativa-retronasal. Isso confirma a boa qualidade e maturação ótima dos frutos utilizados.

Em relação a sensação olfativa-gustativa, na nota complexidade e harmonia apresentaram uma grande variação em relação aos valores.

**Quadro 5.** Valores médios para o parâmetro sensorial com a adição de diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão).

Sensações Olfactativas	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Ensaio 11	Ensaio 12	Ensaio 13
Folhas (%)	5	0	10	0	5	5	10	0	5	10	5	5	5
Tempo (min)	30	40	20	20	30	30	30	30	20	40	40	30	30
Frutado	5,4±0,66	5,5±0,55	5,5±0,55	5,6±0,66	5,3±0,42	5,6±0,66	6,0±0,00	5,8±0,41	5,9±0,20	5,8±0,41	5,9±0,20	6,0±0,00	6,3±0,42
Outros Frutos	1,8±0,27	1,8±0,27	1,5±0,45	1,8±0,26	1,4±0,20	1,7±0,26	1,6±0,00	1,3±0,41	1,7±0,41	1,2±0,26	1,3±0,26	1,3±0,26	1,3±0,27
Verde	1,4±0,20	1,4±0,20	1,4±0,20	1,3±0,26	1,2±0,26	1,4±0,20	1,1±0,00	1,0±0,00	1,4±0,20	1,4±0,20	1,4±0,20	1,5±0,00	1,5±0,00
Outras Sensações	1,8±0,27	1,7±0,26	1,7±0,26	1,8±0,27	1,6±0,20	1,7±0,26	1,5±0,35	1,2±0,26	1,5±0,00	1,2±0,26	1,4±0,20	1,3±0,26	1,5±0,00
Harmonia	16,0±0,00	16,6±0,49	16,8±0,26	16,6±0,49	16,4±0,49	16,1±0,20	16,3±0,35	16,1±0,20	16,2±0,26	16,1±0,20	16,2±0,26	16,3±0,41	16,5±0,32
<b>SOMA</b>	<b>26,3±0,68</b>	<b>26,9±0,49</b>	<b>26,9±1,02</b>	<b>27,1±1,07</b>	<b>25,8±0,68</b>	<b>26,4±0,80</b>	<b>26,5±0,71</b>	<b>25,4±0,80</b>	<b>26,7±0,52</b>	<b>25,7±0,68</b>	<b>26,3±0,42</b>	<b>26,5±0,45</b>	<b>27,0±0,55</b>
<b>Sensações Gustativas:</b>													
Frutado	7,0±0,00	7,0±0,00	6,8±0,41	6,7±0,52	6,5±0,55	7,0±0,63	6,8±0,71	6,6±0,49	6,4±0,49	7,0±0,00	6,8±0,42	6,8±0,41	6,8±0,42
Doce	2,5±0,45	2,5±0,55	2,5±0,55	2,7±0,75	2,8±0,61	2,6±0,66	3,0±0,71	3,1±0,20	3,0±0,00	3,1±0,38	2,9±0,38	2,8±0,26	2,8±0,27
Amargo	1,8±0,26	2,2±0,52	1,7±0,26	1,8±0,26	1,6±0,20	1,8±0,41	1,7±0,00	1,1±0,20	1,1±0,20	1,1±0,20	1,3±0,42	1,8±0,26	2,0±0,00
Picante	2,0±0,45	2,3±0,26	2,3±0,27	2,2±0,26	1,9±0,38	2,0±0,45	1,8±0,35	1,6±0,58	1,8±0,42	1,5±0,32	1,6±0,38	1,7±0,26	1,9±0,38
Verde	1,5±0,00	1,5±0,00	1,3±0,26	1,4±0,38	1,3±0,27	1,3±0,26	1,0±0,35	1,0±0,00	1,5±0,00	1,3±0,26	1,3±0,26	1,5±0,00	1,5±0,00
Outras sensações	1,6±0,20	1,8±0,27	1,8±0,27	1,7±0,26	1,6±0,20	1,6±0,20	1,5±0,35	1,1±0,20	1,1±0,20	1,1±0,20	1,1±0,20	1,2±0,26	1,5±0,00
Harmonia	16,2±0,41	16,4±0,49	16,5±0,55	16,5±0,55	16,2±0,41	16,2±0,41	16,2±0,71	16,0±0,00	16,1±0,20	16,0±0,00	16,1±0,20	16,0±0,00	16,1±0,20
<b>SOMA</b>	<b>32,6±0,92</b>	<b>33,7±1,13</b>	<b>32,8±0,93</b>	<b>32,9±0,80</b>	<b>31,8±1,29</b>	<b>32,5±1,10</b>	<b>31,9±1,77</b>	<b>30,4±0,86</b>	<b>30,9±0,49</b>	<b>31,1±0,38</b>	<b>31,0±1,48</b>	<b>31,8±0,52</b>	<b>32,5±0,32</b>
<b>Sensação Final:</b>													
Complexidade	7,3±0,41	7,2±0,41	7,2±0,41	7,3±0,52	6,9±0,20	6,8±0,41	7,0±0,71	6,8±0,41	7,0±0,32	7,0±0,00	7,0±0,00	7,0±0,00	7,0±0,00
Persistência	7,6±0,49	7,7±0,52	7,6±0,66	7,3±0,52	7,0±0,63	7,0±0,89	7,4±0,00	7,2±0,41	7,3±0,41	7,1±0,20	7,1±0,20	7,5±0,45	7,1±0,20
<b>SOMA</b>	<b>14,9±0,49</b>	<b>14,8±0,75</b>	<b>14,8±0,61</b>	<b>14,7±0,82</b>	<b>13,9±0,66</b>	<b>13,8±1,17</b>	<b>14,4±0,71</b>	<b>14,0±0,63</b>	<b>14,3±0,41</b>	<b>14,1±0,20</b>	<b>14,1±0,20</b>	<b>14,5±0,45</b>	<b>14,1±0,20</b>
<b>TOTAL</b>	<b>73,8±1,66</b>	<b>75,4±1,72</b>	<b>74,5±1,58</b>	<b>74,7±2,27</b>	<b>71,5±2,07</b>	<b>72,8±2,56</b>	<b>72,8±3,18</b>	<b>69,8±1,75</b>	<b>71,9±0,66</b>	<b>70,8±1,08</b>	<b>71,3±1,57</b>	<b>72,8±0,75</b>	<b>73,6±0,58</b>



**Figura 4.** Sensações olfativas, gustativa retronasal e olfativa gustativa de azeites com diferentes percentagens de folhas e tempo de batedura.

### **4.3. Composição**

#### **4.3.1. Ácidos gordos**

O perfil em ácidos gordos dos azeites extraídos encontra-se no quadro 6. Esse perfil em ácidos gordos foi avaliado com o objetivo de verificar se a adição de diferentes quantidades de folhas de oliveira durante o processo de extração do azeite quando sujeito a diferentes tempos de batadura das pastas de azeitonas da Cv. Cobrançosa.

Em todas as amostras, o perfil encontrado é característico para azeites, encontrando-se concordante com o Regulamento (CEE) nº 2568/91 posteriores alterações. O ácido oleico (C18:1), foi o ácido gordo maioritário, variando entre 73,63% e 74,91%, observando-se um ligeiro aumento em condições onde o tempo de batadura são mais extremas. Este ácido gordo maioritário do azeite, tem propriedades biológicas reconhecidas. No organismo humano, o ácido oleico tem um efeito positivo ao nível do aumento no plasma das lipoproteínas de alta intensidade (HDL) e uma diminuição das lipoprotéínas de baixa densidade (LDL) (Ghanbari et al., 2012).

O ácido palmítico (C16:0) foi o segundo ácido gordo mais abundante, variou de 10,4% e 11,82%, apresentando os valores menores para condições isenta de adição de folhas e para valores que apresentam percentagem e tempo de batadura intermediários. Seguido do ácido linoleico (C18:2), o qual apresentou uma variação de 6,60% e 6,91%, apresentando os maiores valores para condições onde o tempo de batadura são extremas.

A cultivar de oliveira utilizada no presente trabalho foi a Cv. Cobrançosa, encontrando-se o perfil de acordo com o observado para azeites extraídos da mesma cultivar e mesmo índice de maturação em trabalhos anteriormente publicados, nomeadamente por (Matos et al., 2007), autores que reportam valores para o ácido oleico de 76,16% e 10,12% para o ácido palmítico e 6,35% para o ácido linoleico. Com isso, observou-se que diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura, diminuem a quantidade de ácido oleico, porém em determinadas condições podem aumentar a quantidade de ácido palmítico e linoleico.

Segundo Malheiro et al. (2013), diferentes percentagens de folhas podem influenciar na composição desses ácidos maioritários de azeites extraídos com a mesma cultivar. Relata-se uma diminuição de ácido oleico em azeites com adição de 10% de

folhas, nesta mesma condição ou na condição controle observou-se um aumento no teor de ácido palmítico, porém o maior aumento para essa percentagem de folhas foi em relação ao ácido linoleico. O agrupamento dos ácidos gordos nas suas diferentes categorias de gordos saturados (SFA – Saturated Fatty Acids), os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA – Mono Unsaturated Fatty Acids) e os ácidos gordos polinsaturados (PUFA – Poly Unsaturated Fatty Acids), é apresentado no quadro 7.

Os ácidos gordos monoinsaturados foram majoritários em relação aos demais, variando de 75,20% a 76,43%, sendo notável a influência do tempo de batadura para esse parâmetro, valores crescentes de batadura aumentaram o teor de MUFA. Jimenez et al. (2014) também obtiveram valores em torno de 73% de ácidos gordos monoinsaturados, mais especificamente o ácido oleico. Quando o tempo de batadura foi aumentado de 45 para 90 min não houve diferença significativa nos valores encontrados pelos autores. (Youssef et al., 2013) observaram que a principal mudança na composição de ácidos gordos associada com aumento no tempo de batadura (60 min) foi um aumento na quantidade de ácido palmítico e um decréscimo na de ácido oleico para as cultivares Chetoui e Chemlali,. utilizaram da adição de  $\text{CaCO}_3$  (carbonato de cálcio) durante a batadura como coadjuvante de extração e não observaram aumento na extração de ácidos gordos após a adição de 1,6% de  $\text{CaCO}_3$  (Ben Brahim et al., 2015).

Os ácidos gordos saturados variaram de 15,92% a 17,11%, notando-se que valores intermediários tanto de percentagem de folhas como de tempo de batadura, mantem-se valores altos. Porém valores extremos de batadura sem a atuação das folhas, diminuem esses valores. Os ácidos gordos polinsaturados, os quais devido a sua insaturações são mais susceptíveis aos fenómenos oxidativos, apresentaram uma variação suave de 7,59% a 7,90%. Sendo nítido que em 10% de folhas e diferentes tempos crescente de batadura, apresenta-se elevado valores para PUFA.

As oliveiras da Cv. Cobrançosa em estudo, foram cultivadas em um sistema sequeiro, sem irrigação, onde a água que tiveram disponível proveio exclusivamente das chuvas, a falta de água para a subsistência da planta, provoca alterações na composição química dos frutos. Provocando um menor de teor de água na polpa das azeitonas, devido a esse estresse hídrico, a planta produz frutos mais ricos em composto como forma de sobrevivência.

**Quadro 6.** Quadro 6 - Perfil em ácidos gordos (g/100 g de ácidos gordos) de azeites Cv. Cobrançosa, extraídos com diferentes percentagens de adição de folhas de oliveira e diferentes tempo de batedura das pastas (média  $\pm$ desvio padrão).

Ensaio	Folhas (%)	Tempo (min)	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0	Isômeros trans
1	5	30	0,01 $\pm$ 0,01	11,01 $\pm$ 0,59	0,77 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	4,59 $\pm$ 0,20	74,29 $\pm$ 0,60	6,68 $\pm$ 0,22	0,99 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
2	0	40	0,01 $\pm$ 0,00	10,48 $\pm$ 0,19	0,80 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,00	4,49 $\pm$ 0,16	74,61 $\pm$ 0,37	6,91 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,10	0,59 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02
3	10	20	0,01 $\pm$ 0,00	10,69 $\pm$ 0,43	0,77 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	4,58 $\pm$ 0,08	74,34 $\pm$ 0,78	6,89 $\pm$ 0,29	0,99 $\pm$ 0,06	0,57 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
4	0	20	0,01 $\pm$ 0,00	10,84 $\pm$ 0,18	0,78 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02	4,61 $\pm$ 0,09	74,19 $\pm$ 0,28	6,91 $\pm$ 0,22	0,98 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01
5	5	30	0,01 $\pm$ 0,01	10,63 $\pm$ 0,21	0,77 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,03	4,61 $\pm$ 0,10	74,51 $\pm$ 0,25	6,76 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,02
6	10	30	0,01 $\pm$ 0,00	10,61 $\pm$ 0,18	0,76 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	4,49 $\pm$ 0,13	74,91 $\pm$ 0,13	6,61 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,02
7	0	30	0,02 $\pm$ 0,01	10,98 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02	4,51 $\pm$ 0,17	74,08 $\pm$ 0,47	6,91 $\pm$ 0,40	0,99 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,03
8	5	20	0,01 $\pm$ 0,01	10,78 $\pm$ 0,65	0,79 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,01	4,63 $\pm$ 0,17	74,33 $\pm$ 0,68	6,69 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
9	10	40	0,00 $\pm$ 0,01	11,80 $\pm$ 0,90	0,87 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,03	4,42 $\pm$ 0,15	73,63 $\pm$ 0,97	6,72 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,01
10	5	40	0,02 $\pm$ 0,01	11,27 $\pm$ 0,64	0,83 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,00	4,35 $\pm$ 0,06	74,21 $\pm$ 0,64	6,73 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,03
11	5	40	0,01 $\pm$ 0,01	11,82 $\pm$ 1,69	0,85 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02	4,40 $\pm$ 0,36	73,71 $\pm$ 1,10	6,78 $\pm$ 0,21	0,94 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,10	0,27 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,02
12	5	30	0,02 $\pm$ 0,03	11,60 $\pm$ 0,83	0,86 $\pm$ 0,10	0,17 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,03	4,37 $\pm$ 0,29	73,97 $\pm$ 0,84	6,60 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,03
13	5	30	0,01 $\pm$ 0,01	10,79 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	4,50 $\pm$ 0,08	74,48 $\pm$ 0,34	6,82 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,02

**Quadro 7** - Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados extraídos em diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão).

Ensaio	Folhas (%)	Tempo (min)	Σ SFA	Σ MUFA	Σ PUFA
1	5	30	16,52±0,82	75,82±0,65	7,66±0,26
2	0	40	15,92±0,40	76,18±0,45	7,89±0,28
3	10	20	16,23±0,58	75,87±0,85	7,88±0,34
4	0	20	16,40±0,32	75,73±0,35	7,89±0,26
5	5	30	16,18±0,38	76,09±0,39	7,77±0,13
6	5	30	16,02±0,36	76,43±0,17	7,60±0,19
7	10	30	16,44±0,37	75,63±0,60	7,90±0,43
8	0	30	16,38±0,90	75,92±0,75	7,70±0,15
9	5	20	17,11±1,14	75,20±1,14	7,71±0,18
10	10	40	16,52±0,81	75,78±0,76	7,73±0,16
11	5	40	17,07±2,25	75,25±1,35	7,72±0,26
12	5	30	16,86±1,28	75,58±1,06	7,59±0,12
13	5	30	16,21±0,35	76,02±0,43	7,79±0,10

#### 4.3.2. Composição em tocoferóis

Nas amostras avaliadas foram detetados e quantificados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - tocoferol. Os tocoferóis são um dos responsáveis na resistência ao processo de oxidação lipídica (Seppanen et al., 2010), atuando como agentes antioxidante no azeite, devido à capacidade de doar seus hidrogénios aos radicais livres interrompendo a propagação em cadeia (Ramalho & Jorge, 2006).

A seguir no quadro 8, encontra-se detalhadamente o perfil de tocoferóis. O  $\alpha$ - tocoferol foi o composto mais abundante, os valores situaram entre 237,5±6,3 mg/kg para condição de 5% de folhas e 40 minutos de batadura, até 276,3 ±9,1 mg/kg para condição isenta de folhas e com tempo intermediário de batadura.

O  $\gamma$ - tocoferol, foi o segundo isómero mais abundante, variando de 8,9±0,9mg/kg para condição em que a adição de folhas e tempo de batadura são intermediarias, e apresentando maior valor nas mesmas condições, 11,0 ±0,6 mg/kg. Seguido pelo  $\beta$ - tocoferol, o qual com diferentes porcentagens de folhas e diferentes tempo de batadura, variou suavemente, de 2,6±0,4mg/kg até 3,3±0,1 mg/kg.

A soma de todos os tocoferóis quantificados, resulta no teor de vitamina E, o qual pode variar dependendo do cultivar, dos fatores agronómicos e também de fatores tecnológicos (Belitz et al., 2009). Dentre as condições experimentais avaliadas os teores

de vitamina E variaram entre 262,9±5,5 e 289,5±10,1 mg/kg para as condições de 30 min com 5% de folhas adicionadas e de 30 min sem adição de folhas respectivamente.

**Quadro 8.** Composição em tocoferóis (mg/kg) de azeites da Cv. Cobrançosa extraídos com diferentes percentagens de adição de folhas de oliveira e diferentes tempo de batadura das pastas (média ±desvio padrão).

Ensaio	Folhas (%)	Tempo (min)	$\alpha$ -tocoferol	$\beta$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	Vit. E Total
1	5	30	271,0±9,7	3,3±0,1	11,0±0,6	285,2±10,4
2	0	40	271,3±20	3,1±0,3	10,4±0,3	284,9±21,0
3	10	20	258,2±8,3	3,2±0,1	10,5±0,3	271,9±8,7
4	0	20	255,9±7,4	2,9±0,2	9,8±0,3	268,6±7,8
5	5	30	269,0±2,6	3,3±0,1	10,5±0,5	282,8±3,2
6	5	30	255,6±2,4	2,9±0,4	9,6±0,8	268,0±3,5
7	10	30	259,0±9,2	3,0±0,1	9,7±0,3	271,7±9,6
8	0	30	276,3±9,1	3,0±0,2	10,3±0,8	289,5±10,1
9	5	20	253,7±7,6	2,8±0,2	9,2±0,8	265,6±8,7
10	10	40	256,4±12,9	2,8±0,3	10,1±1,0	269,3±14,2
11	5	40	237,5±6,3	2,7±0,2	9,5±0,6	249,7±7,1
12	5	30	251,4±4,2	2,6±0,4	8,9±0,9	262,9±5,5
13	5	30	244,5±6,0	2,8±0,2	9,5±0,7	256,9±6,9

Warner et al. (2003) sugerem que a atividade antioxidante dos tocoferóis depende de alguns parâmetros, entre eles, da temperatura, composição e forma da gordura (líquida, emulsão) e o teor total de tocoferóis. Em relação à temperatura, pesquisas revelam que essa variável pode ter um efeito significativo no resultado de estudos de oxidação, com o aquecimento térmico o tocoferol sofre degradação favorecendo a formação de produtos de oxidação (Gonçalves et al., 2015).

A atividade antioxidante relativa dos tocoferóis é conforme a sequência:  $\delta > \gamma > \beta > \alpha$  em gordura animal em temperaturas superiores à 60 °C, mas essa ordem é alterada para  $\alpha > \gamma > \beta > \delta$  em 20 e 40 °C. Com isso, o  $\alpha$ -tocoferol além de atuar como antioxidante, pode atuar como pró-oxidante dependendo, entretanto, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação (Ramalho & Jorge, 2006).

### 4.3.3. Teor em Fenóis Totais

O quadro 9, apresenta os valores dos compostos fenólicos totais, variando de 181,9 mg/kg a 265,4 mg/kg, sendo facilmente visível que a percentagem de folhas influencia a quantidade de compostos fenólicos. Sevim et al. (2013) observaram que a adição de 1% e 3% de folhas antes da extração das azeitonas aumentava significativamente o teor de fenólicos em relação ao controle. No presente trabalho foram obtidos os maiores valores para condições isentas de folhas e menores valores para condições que apresentam 10% de folhas. Estes resultados parecerão contrários ao que seria expectável e estão em oposição ao encontrado na bibliografia, contudo, os trabalhos anteriormente efetuados foram sempre realizados com azeitonas sobremaduras, onde o teor em compostos fenólicos é muito reduzido em comparação ao teor encontrado em azeitonas verdes ou no seu estado de maturação adequado (Sousa et al., 2014).

Durante o amadurecimento, ocorrem vários processos metabólicos no fruto, seguido por variações na composição fenólica devido as diferentes vias de biossíntese e biotransformação desses compostos (Rahmanian et al., 2015)

Assim, uma elevada quantidade de fenóis presentes nas azeitonas poderá inviabilizar a incorporação de fenóis provenientes das folhas de oliveira, aumentando a oxidação e redução do teor destes compostos. Numa condição de elevado teor de fenóis, juntamente com a existência de pigmentos, poderá levar à existência de fenómenos de pró-oxidação.

A oleuropeína é o principal composto fenólico em azeitonas verdes e é responsável pelo seu amargor característico, apresentando uma elevada atividade antioxidante. Conforme o fruto torna-se mais maduro, o conteúdo de oleuropeína diminui drasticamente, sendo o hidroxitirosol um dos principais produtos de bioconversão, e um dos compostos antioxidantes mais ativos encontrados no azeite (Sousa et al., 2014).

Os maiores valores para o hidroxitirosol são para condições que apresentam 0% de folhas e diferentes tempos crescente de batedura, notando-se que a adição de folhas influencia diretamente esses teores. A atividade antioxidante do hidroxitirosol é devido a sua doação de hidrogênio e a capacidade sequestrar radicais livres, desenvolvendo um novo radical o qual estabiliza a reação (Bouaziz et al., 2008). Devido a fruto apresentar

índice de maturação ótimo e a adição de folhas serem ricas nesses compostos, notou-se uma supersaturação de compostos antioxidantes, fazendo com que a folha atue como um pró-oxidante.

**Quadro 9.** Valores médios para o teor em fénois totais (mg/kg), hidroxitirosol totais (mg/kg) e tirosol totais (mg/kg) para diferentes percentagem de folhas e tempo de batedura (média±desvio padrão).

Ensaio	Folhas(%)	Tempo(min)	Fénois (mg/kg)	Hidroxitirosol (mg/kg)	Tirosol (mg/kg)
1	5	30	201,9±23,47	128,0±13,69	73,9±9,96
2	0	40	265,4±11,24	174,3±6,85	91,1±4,42
3	10	20	186,8±5,29	116,2±2,88	70,5±3,16
4	0	20	256,3±32,23	165,4±24,67	90,9±8,86
5	5	30	197,1±17,57	122,8±12,98	74,3±4,67
6	5	30	227,8±20,27	146,3±15,50	81,4±4,78
7	10	30	181,9±25,70	108,4±18,99	73,5±6,73
8	0	30	261,6±30,05	167,7±27,44	93,8±2,94
9	5	20	224,7±8,10	140,4±1,82	84,3±6,92
10	10	40	188,1±10,74	108,5±7,21	79,5±3,99
11	5	40	224,3±12,38	136,8±6,48	87,5±6,09
12	5	30	218,4±14,25	137,9±9,68	80,5±5,03
13	5	30	212,5±11,26	130,3±10,38	82,3±1,05

O mesmo fato foi observado para os teores de tirosol, o qual teve uma variação de 70,5 mg/kg e 93,8 mg/kg, para valores extremos da atuação das folhas e condição isenta delas, respectivamente. Notando-se novamente a atuação da folha como pró-oxidante.

#### 4.4. Atividade sequestradora de radicais livres

##### 4.4.1. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•)

Para determinar a capacidade oxidante, um dos métodos utilizados é através da medida do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Neste método, a atividade sequestradora do radical de DPPH foi expressa em % de inibição, os valores encontram-se no quadro 10.

O evento que apresenta maior atividade sequestradora do radical DPPH, foi a amostra que está isenta de folhas de oliveira e 20 min de batadura ( $74,93 \pm 3,41$ ) e de menor valor  $52,14 \pm 3,64$ , com maior percentagem de folhas e maior tempo de batadura. Sevim et al. (2013), concluíram que com o aumento da quantidade de folhas de oliveira adicionadas os valores de DPPH• aumentavam significativamente possivelmente como resultado do aumento da concentração de clorofila, compostos fenólicos e teor de tocoferol. No presente trabalho todos os resultados citados por Sevim et al. (2013) foram contrários, ou seja, menores quando houve o aumento na quantidade de folhas adicionadas.

**Quadro 10.** Valores para os parâmetros DDPH e ABTS em azeites com diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura (média±desvio padrão).

Amostras	Folhas (%)	Tempo (min)	DDPH	ABTS
1	5	30	68,68±4,91	93,55±1,74
2	0	40	73,65±2,87	94,72±0,47
3	10	20	61,95±4,97	94,83±0,21
4	0	20	74,93±3,41	94,30±0,94
5	5	30	62,15±1,50	94,81±0,28
6	5	30	66,31±4,20	94,72±0,21
7	10	30	57,33±5,35	94,88±0,26
8	0	30	71,42±6,09	94,55±0,49
9	5	20	62,18±3,83	94,19±1,12
10	10	40	52,14±3,64	94,07±0,55
11	5	40	61,07±1,84	94,37±0,47
12	5	30	64,78±3,52	93,98±0,93
13	5	30	64,61±4,06	93,75±0,97

Brahmi et al. (2015), estudou a existência correlação entre teor em fenóis e a sua atividade antioxidante de folhas de oliveira da Cv. Chetoui, verificando que essa correlação foi significativa, tem sido relatado que a eliminação dos radicais livres é influenciada por fatores climáticos, cultivar e tempo de colheita que potencializa a eficácia antioxidante dos compostos presentes nas folhas.

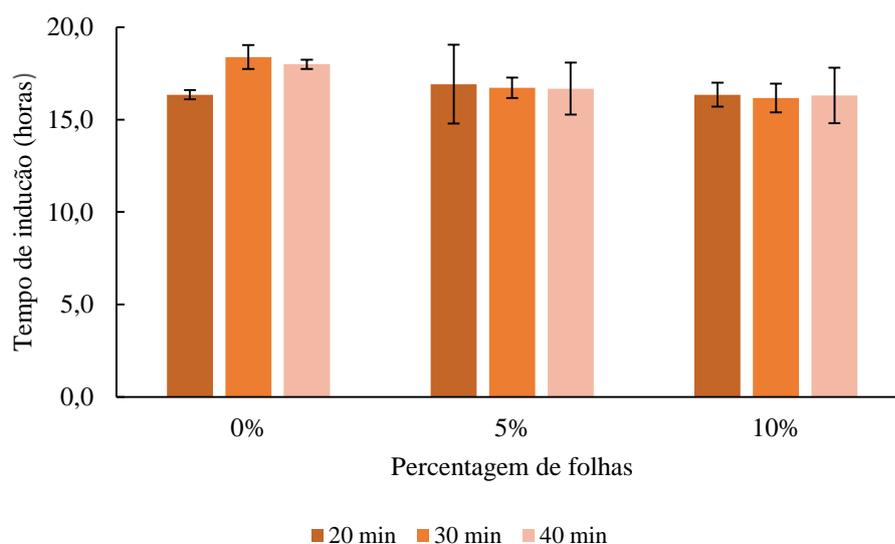
#### 4.4.2. Atividade sequestradora do radical ABTS (ABTS•+)

Os valores médios obtidos da atividade sequestradora do radical ABTS, estão apresentados no quadro 10. Ao contrário dos resultados de DPPH, estes apresentaram resultados iguais a  $93,55 \pm 1,74$  para condições intermediárias de porcentagem de folhas e tempo de batadura, até  $94,88 \pm 0,26$ , com 10% de folhas e 30 min de batadura. Ou seja, a maior atividade antioxidante neste caso foi obtida para as condições experimentais onde se aplicaram a maior porcentagem de folhas e o tempo de batadura foi baixo e intermediário.

Para a realização desse teste, foi utilizado o etanol como solvente, porém sabe-se que o etanol e óleos vegetais não são miscíveis, não havendo uma diluição completa, por isso pode haver alguma dificuldade para medir a capacidade antioxidante. Além disso, mesmo pequena quantidade de água no meio da reação causaria provavelmente opacidade com o qual as medições espectrofotométricas imprecisas pode resultar (Durmaz, 2012). Por isso pode ter havido controversas com o método DPPH.

#### 4.5. Estabilidade oxidativa

Os valores obtidos, para as diferentes amostras de azeite extraído na presença e quantidades diferentes de folhas e tempos de batadura diferentes, encontram-se representado na figura 5.



**Figura 5.** Resistência à oxidação, em horas, de azeites com diferentes percentagens de folhas e diferentes tempo de batadura.

Graficamente observou-se que os maiores valores para tempo de indução foram para amostras que estão isenta de folhas, mostrando que o tempo de batadura nesse parâmetro não foi a variável que influenciou a estabilidade oxidativa. Isso é devido ao fato dos frutos utilizados apresentarem um índice de maturação 4, são frutos que apresentam grande quantidade de compostos fenólicos, diferentes de frutos sobremaduros o qual a adição de folhas de oliveira, fazem com que “renove” a quantidade desses compostos. Além disso, esses frutos apresentam grande quantidade de clorofila que se degradam conforme o tempo de maturação, com a adição de folhas o qual apresentam elevados teor de clorofila, fazem com que atuam como pró-oxidante, isto é, quando expostos à luz, devido às características fotossensibilizantes do anel porfirina dessas moléculas, facilitam a formação de oxigênio e conseqüentemente ocorre o processo de autooxidação (Ghanbari et al., 2012).

#### **4.6. Determinação da cor**

Os resultados relativos à avaliação da cor estão apresentados no quadro 11. A determinação da cor de um alimento é de extrema importância, pois é o primeiro contacto do produto com o consumidor. Quando é elaborado um género alimentício deve ter-se em conta este parâmetro, para tornar então mais atrativo e incentivar a compra do produto. A presença desses pigmentos, não só determina a cor do produto, como também possui um papel importante na atividade oxidativa do azeite, devido à sua natureza antioxidante na ausência de luz e pró-oxidante na presença (Oueslati et al., 2009).

As amostras foram avaliadas conforme a coordenada de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  (CIELAB), que é um dos sistema mais utilizados em relação a colorimetria. O parâmetro  $L^*$  é responsável pela luminosidade apresentando valores constantes para as amostras. Já o parâmetro  $a^*$ , é responsável ao conteúdo vermelho a verde, nota-se que os maiores valores são para condições isentas de folhas e os menores valores para os ensaios que foram adicionados elevada percentagem de folha, tal fenómeno é devido a grande saturação de compostos clorofilicos, devido a grande quantidade de pigmentação verde tanto das folhas como dos frutos que foram colhidos em um tempo de colheita ótimo, com isso, esses compostos atuam como pró-oxidante, devido a supersaturação desses compostos (Küpper et al., 2002). Porém o tempo de batadura influência também a coloração do

azeite, pelo fato de quanto maior o tempo de batadura, maior o contato do azeite com as folhas, maior a coloração verde.

#### 4.7. Composição Volátil

Nos azeites obtidos pela adição de diferentes percentagem de folha e tempos de batadura das pastas durante o processo de extração do azeite, foram identificados um total de 22 compostos voláteis encontrando-se a sua composição detalhada no quadro 12. Desses compostos, seis são **aldeídos**, nomeadamente: (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2,4-hexadienal, benzaldeído, nonanal e decanal; cinco são **alcoóis**: (*Z*)-3-hexen-1-ol, hexanol, álcool benzílico, octanol e fenietil álcool; dois são **ésteres**: (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato e acetato de hexilo; três **sesquiterpenos**:  $\alpha$ -copaene, cariofileno e  $\alpha$ -farneseno; dois **terpenos**: limoneno e  $\beta$ -ocimeno; uma **cetona**: 2-heptanone; e três **alcenos**: dois isômeros de 3-etil-1,5 octadieno e dodecano.

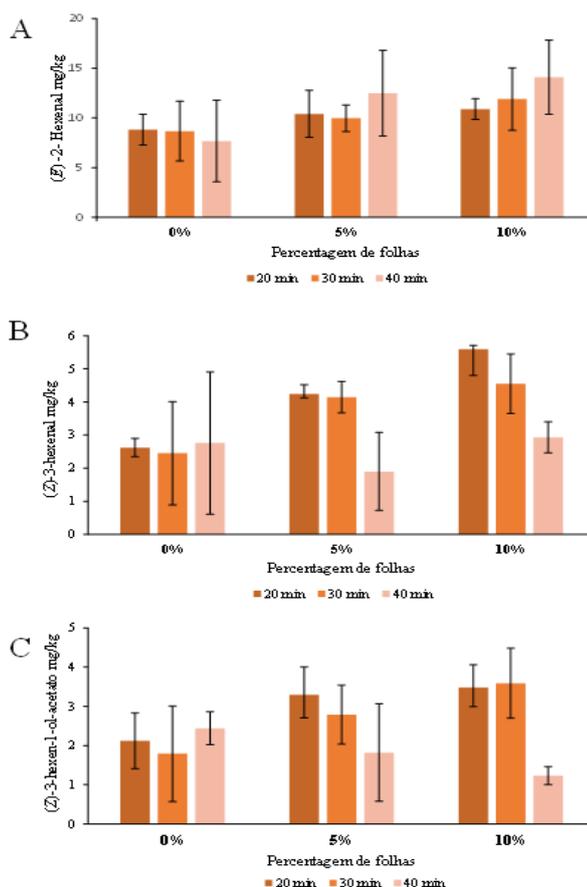
Quantitativamente no geral, os alcenos e os ésteres foram o grupo de voláteis de maior importância. Os compostos (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2 hexenal e o (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato, foram os maioritários.

Os aldeídos representam a fração mais importante de compostos voláteis em relação a alta qualidade dos azeites virgens, do ponto de vista quantitativos. Esse grupo de compostos é produzido enzimaticamente a partir de ácidos gordos polinsaturados, através do nível e da atividade de cada enzima envolvida no mecanismo chamado de LOX-lipoxigenase (Angerosa et al., 2004). A partir dos ácidos gordos linolénico e linoleico a lipoxigenase atua e produz 13 hidroperóxidos, que são catalisados pelas hidroperóxidos-liases, transformando esses compostos em aldeído (hexenal e 3-hexenal). A enzima isomerase atua nesses aldeídos produzindo 2-hexenal. Pode haver também a atuação da enzima álcool-desidrogenase que produz álcool a partir desses aldeídos e forma o composto (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato sob a atuação da enzima álcool transferases de acetilo (Angerosa et al., 2004; Hatanaka, 1993). Todos esses últimos compostos formados são em geral, o que apresentam em maior quantidade.

Estudando particularmente os compostos, (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenal e o (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato, que foram os compostos voláteis que apresentaram maior teor durante a combinação de diferentes percentagens de folha de oliveira e diferentes tempo de batadura, nota-se que a combinação desses parâmetros influenciaram o composto (*E*)-2-hexenal, figura 6a. O tempo de batadura é o parâmetro que mais aumenta esse

composto. Isso ocorre porque quando as azeitonas não apresentam nenhum tipo de rutura e em condições normais, não apresentam o (*E*)-2-hexenal no seu perfil volátil. A formação desse composto só é obtida quando o tecido celular do fruto é rompido, formada pela via da lipoxigenase (LOX), que atuam nos ácidos gordos polinsaturados como mencionado (Malheiro et al., 2013). Esse fato é bem patente na figura 6 a, maiores tempo de batadura, proporcionam maior rompimento celular do fruto, conseqüentemente maior quantidade desse composto volátil.

O composto (*E*)-2-hexenal em relação a percepção sensorial é descrita por apresentar sensações amargas, juntamente com aroma verde e “erva (grama) fresca cortada”, além de poder apresentar aroma de outros frutos, como amêndoa e maçã verde (Angerosa et al., 2004). Com isso a adição de folhas contribuiu levemente para a percepção dessas notas sensoriais.



**Figura 6.** Teor dos compostos voláteis maioritários em relação a à percentagem de folhas (0, 5 e 10%) e tempo de batadura (20, 30 e 40 min.) para os compostos A - (*E*) - 2-hexenal (mg/kg); B - (*Z*) - 3-hexenal (mg/kg); C - (*Z*) - 3-hexen-1-ol acetato (mg/kg).

**Quadro 11.** Valores médios para a determinação da cor, modo CIELAB (L\*, a\* e b\*) e HUNTER (L, a e b) para azeites com diferentes percentagem de folhas e tempo de batedura (média±desvio padrão).

Evento	Folhas (%)	Tempo (min)	CIELAB			HUNTER		
			L*	a*	b*	L	a	b
1	5	30	76,56±1,00	-16,18±0,57	35,86±2,01	71,28±1,16	-14,57±0,42	39,79±0,37
2	0	40	80,66±1,55	-10,57±1,05	34,37±2,27	76,08±1,15	-14,57±0,43	39,76±0,32
3	10	20	80,35±2,98	-14,53±1,71	49,49±2,46	75,72±1,17	-14,57±0,43	39,76±0,32
4	0	20	82,93±0,66	-7,52±1,40	19,92±2,03	78,76±2,05	-13,99±2,00	37,90±2,89
5	5	30	81,85±1,75	-12,04±1,35	36,16±2,95	77,48±2,57	-13,40±2,66	36,00±2,82
6	5	30	79,73±1,21	-14,57±1,41	38,08±2,46	74,97±2,94	-12,82±3,06	34,09±2,90
7	10	30	78,05±1,11	-17,65±0,46	64,87±2,15	73,01±2,88	-12,82±3,02	34,07±2,76
8	0	30	82,75±1,79	-6,51±1,433	16,53±2,92	78,55±2,84	-12,82±2,99	34,06±2,67
9	5	20	79,21±1,35	-14,15±1,19	46,24±2,12	74,37±2,83	-12,82±3,02	34,03±2,73
10	10	40	76,44±5,41	-16,80±1,35	61,00±2,23	71,23±2,87	-12,82±3,06	34,03±2,86
11	5	40	80,26±1,80	-13,82±1,72	43,78±1,31	75,61±2,80	-12,37±3,02	33,07±2,70
12	5	30	82,87±0,19	-9,25±1,75	33,90±2,98	78,69±2,57	-11,93±2,90	32,05±2,35
13	5	30	82,79±1,28	-10,01±1,69	38,67±1,24	78,59±2,22	-11,49±2,70	31,04±2,84

O tempo de batadura originou alterações na composição volátil do azeite, provocando acumulação de álcoois e de aldeídos, especialmente de hexenal. Estudos de (Angerosa, 2002), revelam que o tempo de batadura influencia a qualidade do azeite extraído, temperaturas baixas ( $\leq 25$  °C) e tempos médios (35-45 min) são as melhores condições para a formação de compostos voláteis característico da percepção verde nos azeites. Além disso, atuam no decréscimo de concentrações elevadas de alguns compostos que estão relacionados com o fenómeno de degradação da matéria-prima e inversamente relacionada com a qualidade sensorial do azeite.

O composto (*Z*)-3-hexenal também formado pelo mecanismo da LOX, apresentando influência nos parâmetros percentagem de folhas e tempo de batadura. Conforme a figura b, houve um crescimento crescente em teor desse composto conforme o aumento de percentagem de folhas e menor tempo de batadura. Esse composto é sensorialmente conhecido pelo aroma de folhas verdes. Porém esses parâmetros não contribuíram de forma eficaz na sensorial desses azeites.

O éster (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato um dos compostos maioritários neste estudo, conforme a figura 6 c, nota-se a influência da adição de folhas, porém esse crescimento é claro em eventos isentos de folhas comparados com eventos que apresentam 5% de folhas, após essa percentagem não é tão relevante. O aumento do teor desse composto foi evidenciado em menores tempo de batadura. Para a formação desse composto foi realizada pelo princípio do mecanismo da lipoxigenase (LOX), apartir da ação da enzima ácool acetiltransferases, o qual converteu o (*Z*)-3-hexen-1-ol em (*Z*)-3-hexen-1-ol acetato. Esse composto é caracterizado por apresentar odor de banana, fruta verde e folhas verdes (Pouliarekou et al., 2011).

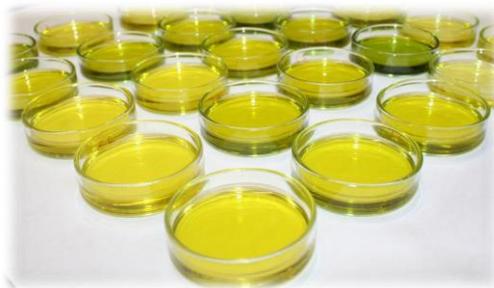
**Quadro 12.** Perfil volátil de azeites da Cv. Cobrançosa (mg/kg; valores a negrito estão expressos em µg/kg) extraídos com diferentes percentagens de folhas de oliveira e diferentes tempos de extração ( média ± desvio padrão).

N	Composto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Valor de P
		<b>5%</b> 30 min	<b>0%</b> 40 min	<b>10%</b> 20 min	<b>0%</b> 20 min	<b>5%</b> 30 min	<b>5%</b> 30 min	<b>10%</b> 30 min	<b>0%</b> 30 min	<b>5%</b> 20 min	<b>10%</b> 40 min	<b>5%</b> 40 min	<b>5%</b> 30 min	<b>5%</b> 30 min	
1	(Z)-3-hexenal	4,25 b-d (0,35)	2,76 a-c (0,79)	5,59 d (2,15)	2,62 a-c (0,28)	4,48 b-d (1,74)	3,59 a-d (0,74)	4,55 c,d (1,18)	2,45 a,b (0,12)	4,24 b-d (1,56)	2,93 a-c (0,47)	1,90 a (0,90)	3,70 a-d (0,27)	4,65 c,d (0,18)	<0.001*
2	(E)-2-hexenal	9,36 a,b (1,95)	7,68 a (1,04)	10,9 a,b (4,12)	8,83 a,b (1,56)	8,78 a,b (1,20)	8,91 a,b (0,41)	11,9 a,b (4,31)	8,67 a,b (2,36)	10,4 a,b (3,00)	14,1 b (3,74)	12,5 a,b (3,15)	11,7 a,b (3,03)	11,1 a,b (3,51)	0.020*
3	(Z)-3-hexen-1-ol	0,12 b (0,03)	0,05 a (0,01)	0,12 b (0,03)	0,09 a,b (0,02)	0,12 b (0,01)	0,11 b (0,02)	0,13 b (0,04)	0,09 a,b (0,02)	0,10 a,b (0,02)	0,12 b (0,04)	0,14 b (0,04)	0,13 b (0,02)	0,10 a,b (0,03)	<0.001*
4	Hexanol	0,66 a (0,06)	0,70 a (0,07)	0,68 a (0,10)	0,70 a (0,03)	0,73 a (0,05)	0,69 a (0,01)	0,60 a (0,15)	0,64 a (0,10)	0,59 a (0,15)	0,64 a (0,11)	0,67 a (0,11)	0,59 a (0,20)	0,66 a (0,15)	0.461*
5	2-Heptanone	0,32 a,b (0,01)	0,35 a,b (0,04)	0,33 a,b (0,04)	0,31 a,b (0,02)	0,32 a,b (0,04)	0,38 b (0,16)	0,28 a,b (0,03)	0,32 a,b (0,03)	0,30 a,b (0,05)	0,27 a (0,03)	0,29 a,b (0,03)	0,29 a,b (0,04)	0,28 a,b (0,01)	<0.001*
6	(E,E)-2,4-hexadienal	0,26 a,b (0,03)	0,14 a (0,03)	0,34 b,c (0,08)	1,21 d (0,05)	0,30 b,c (0,06)	0,25 a,b (0,02)	0,35 b,c (0,13)	0,13 a (0,01)	0,23 a,b (0,10)	0,44 c (0,06)	0,26 a,b (0,13)	0,20 a,b (0,08)	0,26 a,b (0,09)	<0.001*
7	3-Etil-1,5-octadieno	1,39 d,e (0,08)	1,05 a (0,08)	1,41 e (0,07)	1,07 a,b (0,00)	1,21 c (0,03)	1,17 a-c (0,04)	1,24 c,d (0,05)	1,08 a-c (0,10)	1,26 c-e (0,14)	1,18 b,c (0,04)	1,07 a-c (0,09)	1,12 a-c (0,05)	1,09 a-c (0,04)	<0.001*
8	3-Etil-1,5-octadieno	1,44 c (0,19)	1,13 a,b (0,08)	1,43 c (0,08)	1,16 a,b (0,04)	1,23 a,b (0,04)	1,20 a,b (0,06)	1,26 a,b (0,04)	1,15 a (0,07)	1,27 b (0,14)	1,21 a,b (0,03)	1,14 a (0,10)	1,16 a,b (0,09)	1,15 a,b (0,06)	<0.001*
9	Benzaldeído	1,24 a (0,12)	1,30 a (0,37)	1,43 a,b (0,33)	1,48 a-c (0,08)	1,66 a-d (0,29)	1,54 a-c (0,18)	1,48 a-c (0,17)	1,53 a-c (0,10)	1,66 a-d (0,32)	1,86 b-d (0,31)	2,07 d (0,05)	1,90 c,d (0,20)	2,02 d (0,12)	<0.001*
10	(Z)-3-hexen-1-ol acetato	1,97 a-c (0,70)	2,44 a-c (0,49)	3,48 b,c (0,42)	2,12 a-c (0,71)	3,19 b,c (1,52)	3,73 c (1,54)	3,59 b,c (1,24)	1,79 a,b (0,58)	3,29 b,c (1,22)	1,23 a (0,23)	1,82 a,b (0,89)	2,07 a-c (0,99)	2,95 a-c (0,49)	<0.001*
11	Acetato de hexilo	0,12 a,b (0,06)	0,15 a-d (0,04)	0,16 a-d (0,08)	0,14 a-c (0,05)	0,21 b-d (0,10)	0,27 d (0,11)	0,26 c,d (0,06)	0,13 a,b (0,03)	0,18 a-d (0,08)	0,09 a,b (0,01)	0,14 a-c (0,07)	0,07 a (0,02)	0,21 c-d (0,03)	<0.001*
12	Limoneno	0,06 a,b (0,03)	0,06 a,b (0,02)	0,04 a (0,00)	0,09 b (0,03)	0,09 b (0,02)	0,07 a,b (0,02)	0,05 a,b (0,00)	0,07 a,b (0,02)	0,07 a,b (0,03)	0,08 b (0,02)	0,07 a,b (0,03)	0,07 a,b (0,02)	0,07 a,b (0,02)	<0.001*
13	Álcool benzílico	0,31 a (0,06)	0,28 a (0,10)	0,33 a,b (0,12)	0,37 a-c (0,03)	0,43 a-d (0,10)	0,38 a-c (0,06)	0,47 a-d (0,09)	0,39 a-c (0,12)	0,45 a-d (0,06)	0,60 d (0,19)	0,55 c,d (0,07)	0,52 b-d (0,12)	0,55 c,d (0,08)	>0.001**
14	β-ocimeno	0,17 a,b (0,08)	0,14 a (0,06)	0,20 a-c (0,02)	0,22 a-d (0,03)	0,29 b-d (0,06)	0,23 a-d (0,04)	0,28 b-d (0,08)	0,22 a-d (0,07)	0,26 b-d (0,10)	0,31 c,d (0,06)	0,34 d (0,03)	0,23 a-d (0,07)	0,34 d (0,04)	<0.001*
15	Octanol	0,02 a,b (0,00)	0,01 a (0,00)	0,02 a-d (0,01)	0,02 a-d (0,00)	0,02 b-e (0,01)	0,02 a-d (0,00)	0,02 b-e (0,00)	0,02 a-c (0,00)	0,02 a-d (0,00)	0,03 e (0,01)	0,03 d,e (0,00)	0,02 b-d (0,00)	0,03 c-e (0,00)	<0.001*
16	Nonanal	0,08 a,b	0,07 a	0,10 a-c	0,09 a-c	0,13 b-d	0,11 a-d	0,14 c,d	0,06 a	0,08 a,b	0,22 e	0,16 d,e	0,10 a-c	0,09 a-c	<0.001*

17	Feniletil álcool	(0,00) 0,17 a	(0,02) 0,14 a	(0,03) 0,20 a,b	(0,01) 0,14 a	(0,04) 0,28 b-d	(0,01) 0,24 a-d	(0,02) 0,35 d,e	(0,01) 0,15 a	(0,02) 0,24 a-d	(0,07) 0,43 e	(0,02) 0,33 c-e	(0,03) 0,24	(0,01) 0,32	<0.001*
18	Dodecano	(0,03) 0,04 a,b	(0,04) 0,02 a	(0,02) 0,03 a,b	(0,02) 0,05 a,b	(0,08) 0,04 a,b	(0,02) 0,05 a,b	(0,07) 0,04 a,b	(0,03) 0,05 a,b	(0,06) 0,07 b	(0,09) 0,19 c	(0,06) 0,06 b	(0,05) 0,04 a,b	(0,07) 0,07 b	<0.001*
19	Decanal	(0,00) <b>2,68 a-c</b> (0,47)	(0,01) n.d.	(0,01) <b>2,62 a-c</b> (0,50)	(0,01) n.d.	(0,02) <b>3,02 a-c</b> (1,35)	(0,02) <b>2,25 a-c</b> (0,41)	(0,01) <b>3,94 b,c</b> (1,20)	(0,02) <b>2,69 a-c</b> (1,06)	(0,02) <b>2,42 a,b</b> (0,75)	(0,06) <b>3,62 a-c</b> (0,88)	(0,01) <b>4,25 c</b> (1,06)	(0,00) <b>3,72 a-c</b> (0,88)	(0,02) <b>2,61 a,b</b> (0,71)	<0.001*
20	$\alpha$ -Copaeno	<b>8,47 b</b> (2,81)	<b>3,84 a</b> (1,90)	<b>9,62 b</b> (1,06)	0,01 b (0,00)	0,01 c (0,00)	0,02 c (0,00)	0,01 c (0,00)	<b>2,04 a</b> (0,21)	<b>2,61 a</b> (0,63)	<b>3,92 a</b> (1,37)	0,02 d (0,00)	0,01 c (0,00)	0,02 d (0,00)	<0.001*
21	Cariofileno	<b>4,68 a</b> (0,81)	<b>5,23 a,b</b> (1,65)	<b>6,44 a,b</b> (1,46)	<b>5,50 a,b</b> (0,42)	<b>8,09 b-d</b> (1,85)	<b>8,30 b-d</b> (0,68)	0,01 c-e (0,00)	<b>5,86 a,b</b> (0,99)	<b>8,37 b-d</b> (1,91)	0,02 f (0,00)	0,01 e,f (0,00)	<b>7,68 a-c</b> (1,20)	0,01 d,e (0,00)	<0.001*
22	$\alpha$ -Farneseno	0,08 a,b (0,01)	0,05 a (0,00)	0,10 a,b (0,04)	0,14 a,b (0,02)	0,16 a,b (0,03)	0,15 a,b (0,02)	0,20 b (0,01)	0,15 a,b (0,04)	0,19 b (0,04)	0,34 c (0,13)	0,48 d (0,08)	0,33 c (0,12)	0,44 c,d (0,09)	<0.001*

Dentro da mesma linha, valores médios com letras diferentes difere, significativamente ( $P < 0,05$ );

\* $P < 0,05$  pelo teste de Levene. Os valores de  $P$  são da one-way ANOVA de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett T3's, uma vez que a igualdade de variâncias não foi assumida; \*\*  $P > 0,05$  pelo teste de Levene. Os valores de  $P$  são da one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, uma vez que a igualdade de variâncias foi assumida.



---

## 5. CONCLUSÃO



## 5. CONCLUSÃO

A adição de folhas de oliveira durante o processo de extração do azeite juntamente com o tempo de batadura das pastas, proporcionam alterações na composição dos azeites em azeites da Cv. Cobrançosa.

A utilização da Metodologia de Superfície de Resposta, que é responsável por indicar um ponto ótimo em relação as variáveis escolhidas, neste caso não indicou nenhum tempo de batadura e percentagem de folhas adequado.

O efeito mais notório da adição de folhas foi verificado positivamente aos parâmetros de qualidade e no perfil sensorial, com aumento das sensações a frutado e verde, sendo que todos os azeites poderiam ser classificados na categoria de azeite virgem extra.

Pode também afirmar-se que as condições avaliadas interferiram ao nível da composição em ácidos gordos, sobretudo dos maioritários. Além disso, foi favorável em relação aos compostos voláteis, melhorando significativamente os teores de alguns compostos.

A adição de diferentes percentagens de folhas e tempo de batadura, influenciaram negativamente a atividade antioxidante do azeite, o que estará relacionado com a incorporação de clorofilas, que atuam como agentes pró-oxidantes na presença da luz

Conclui-se, que há a necessidade de equilíbrio entre os parâmetros para que possam influenciar positivamente a qualidade, composição e sensorial dos azeites.



---

## **6. BIBLIOGRAFIA**



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Afonso, S. M. (2014). Utilização de extratos de folhas de oliveira como agente antioxidante. Dissertação em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Bragança, 89.
- Alves, R. C., Casal, S., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 802–808.
- Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. (2009). Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chemistry*, 113, 253–261.
- Andrewes, P., Busch, J. L. H. C., de Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1415–20.
- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 639–660.
- 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*, 1054, 17–31.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., ... Daoud Ben Miled, D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109, 743–54.
- Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H. F., & Correia, C. M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170, 596–605.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3064–72.
- Ben Brahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., & Bouaziz, M. (2015). Optimization of malaxing conditions using CaCO<sub>3</sub> as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 243–252.

- Ben Mansour, A., Flamini, G., Ben Selma, Z., Le Dréau, Y., Artaud, J., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2015). Olive oil quality is strongly affected by cultivar, maturity index and fruit part: Chemometrical analysis of volatiles, fatty acids, squalene and quality parameters from whole fruit, pulp and seed oils of two Tunisian olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. . (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, *68*, 457–462.
- Bouaziz, M., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5476–81.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., & Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, *108*, 253–262.
- Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., & Nucci, R. (2002). *Olea europaea* L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4934–4940.
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, *12*, 219.
- Cecchi, T., Passamonti, P., & Cecchi, P. (2010). Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. *Food Chemistry*, *120*, 730–735.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodriguez-Estrada, M. T., Cerretani, L., & Bendini, A. (2008). Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, *110*, 248–56.
- Civille, G. V., & Oftedal, K. N. (2012). Sensory evaluation techniques - make «good for you» taste «good». *Physiology & Behavior*, *107*, 598–605.
- Clodoveo, M. L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future – An overview. *Trends in Food Science & Technology*, *25*, 13–23.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., & Ben-David, E. (2011). Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*, *127*, 358–366.
- Di Giovacchino, L., Angerosa, F., & Di Giacinto, L. (1996). Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *73*, 371–374.

- Durmaz, G. (2012). Freeze-dried ABTS+ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*, *133*, 1658–1663.
- Farag, R. S., El-Baroty, G. S., & Basuny, A. M. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, *38*, 81–87.
- Farag, R. S., Mahmoud, E. A., & Basuny, A. M. (2007). Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science & Technology*, *42*, 107–115.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, O., Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Martín-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, *163*, 289–98.
- Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 5179–88.
- Gandul Rojas, B., Gallardo Guerrero, L., Garrido Fernández, J., & Mínguez Mosquera, M. I. (2010). Control de pigmentos clorofílicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, *42*, 56–60.
- García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*, 602–607.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., & Saari, N. (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)-A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*.
- Gila, A., Jiménez, A., Beltrán, G., & Romero, A. (2015). Correlation of fatty acid composition of virgin olive oil with thermal and physical properties. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*, 366–376.
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2002). Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6812–6817.
- Gonçalves, R. P., Março, P. H., & Valderrama, P. (2015). Thermal degradation of tocopherol and oxidation products in different olive oil classes using uv-vis spectroscopy and mcr-als. *Química Nova*, *38*, 864–867.
- Gouvinhas, I., de Almeida, J. M. M. M., Carvalho, T., Machado, N., & Barros, A. I. R. N. a. (2015). Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chemistry*, *174*, 226–232.

- Gunstone, F. D. edit. edited by F. D. G. (2015). Vegetable oils in food technology :composition, properties, and uses. *Chemistry and Technology of Oils and Fats*.
- Hatanaka, A. (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, *34*, 1201–1218.
- Jimenez, B., Callejón, R., Sánchez-Ortiz, A., Ortega, E., Lorenzo, M. L., & Rivas, A. (2014). Agronomic parameters, quality indices, and sensory attributes of virgin olive oils from Hojiblanca and Picudo varieties from three successive crop years. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*, 1647–1653.
- Jorge, R. O. (2010). *Caracterização de azeites virgem extra Gourmet'' varietais e Blends'' comercializados no mercado do Rio Grande do Sul*. Dissertação de mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas.
- Kalantzakis, G., Blekas, G., Pegklidou, K., & Boskou, D. (2006). Stability and radicalscavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*, 329-335.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2005). Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 8054–62.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, *119*, 851–858.
- Küpper, H., Dëdic, R., Svoboda, A., Hála, J., & Kroneck, P. M. . (2002). Kinetics and efficiency of excitation energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).General Subjects*, *1572*, 107–113.
- Lukić, M., Lukić, I., Krapac, M., Sladonja, B., & Piližota, V. (2013). Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chemistry*, *136*, 251–8.
- Luna, G., Morales, M. T., & Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, *98*, 243–252.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacityin vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*, 2046–2056.
- Machado, M., Felizardo, C., Fernandes-Silva, A. A., Nunes, F. M., & Barros, A. (2013). Polyphenolic compounds, antioxidant activity and l-phenylalanine ammonia-lyase

- activity during ripening of olive Cv. Cobrançosa under different irrigation regimes. *Food Research International*, 51, 412–421.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2013). Effect of Olive Leaves Addition during the Extraction Process of Overmature Fruits on Olive Oil Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 509–521.
- Matos, L. C., Cunha, S. C., Amaral, J. S., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Oliveira, B. P. P. (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry*, 102, 406–414.
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., & Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190, 513–9.
- Morelló, J.-R., Vuorela, S., Romero, M.-P., Motilva, M.-J., & Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2002–8.
- Nergiz, C., & Ünal, K. (1991). Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 39, 237–240.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). *Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey 2nd Edition*.
- O'Brien, R. D. (2008). *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications, Third Edition*.
- Omar, S. H. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 133–154.
- Oueslati, I., Anniva, C., Daoud, D., Tsimidou, M. Z., & Zarrouk, M. (2009). Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: The commercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry*, 112, 733–741.
- Ouni, Y., Flamini, G., Youssef, N. Ben, Guerfel, M., & Zarrouk, M. (2011). Sterolic composition and triacylglycerols of Oueslati virgin olive oil: comparison among different geographic areas. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1747–1754.
- Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Silva, M., Monteiro, D., Pinheiro, V., Mourão, J. L., ... Santos-Silva, A. (2014). The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells. *Journal of Functional Foods*, 9, 271–279.

- Paiva-Martins, F., Correia, R., Félix, S., Ferreira, P., & Gordon, M. H. (2007). Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4139–43.
- Parisi, O. I., Casaburi, I., Sinicropi, M. S., Avena, P., Caruso, A., Givigliano, F., ... Puoci, F. (2014). *Polyphenols in Human Health and Disease. Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier.
- Pouliarekou, E., Badeka, A., Tasioula-Margari, M., Kontakos, S., Longobardi, F., & Kontominas, M. G. (2011). Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography*, *1218*, 7534–42.
- Procida, G., Cichelli, A., Lagazio, C., & Conte, L. S. (2015). Relationships between volatile compounds and sensory characteristics in virgin olive oil by analytical and chemometric approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 716–721.
- Purcaro, G., Cordero, C., Liberto, E., Bicchi, C., & Conte, L. S. (2014). Toward a definition of blueprint of virgin olive oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography*, *1334*, 101–11.
- Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, *42*, 150–172.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2014). Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils. *Food Chemistry*, *158*, 534–545.
- Rodrigues, J. F. (2015). *Azeites de oliva da região da Serra da Mantiqueira: estudo químico e sensorial para caracterização da qualidade*. Brasil.
- Roig, a., Cayuela, M. L., & Sánchez-Monedero, M. a. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, *26*, 960–969.
- Sacchi, R., Caporaso, N., Paduano, A., & Genovese, A. (2015). Industrial-scale filtration affects volatile compounds in extra virgin olive oil cv. Ravece. *European Journal of Lipid Science and Technology*.

- Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology International*, *13*, 413–421.
- Seppanen, C. M., Song, Q., & Saari Csallany, A. (2010). The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*, 469–481.
- Servili, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., ... Montedoro, G. F. (2009) a. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, *17*, 76–84.
- Servili, M., Piacquadio, P., De Stefano, G., Taticchi, A., & Sciancalepore, V. (2009). Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 483–489.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V. (2006). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, *12*, 385–395.
- Sousa, A., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2014). Antioxidant activity and phenolic composition of Cv. Cobrançosa olives affected through the maturation process. *Journal of Functional Foods*, *11*, 20–29.
- Tan, C. P., Che Man, Y. B., Jinap, S., & Yusoff, M. S. A. (2001). Effects of microwave heating on changes in chemical and thermal properties of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *78*, 1227–1232.
- Tovar, M. J., Romero, M. P., Girona, J., & Motilva, M. J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*, 892–898.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, *18*, 98–112.
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, *118*, 139–148.
- Vaz-Freire, L. T., Palma, V., Gouveia, J. B., & Freitas, A. C. (2007). Comparison of olive oil from Portuguese cultivar Galega Vulgar with two different methods of oil extraction. *Inovação Tecnológica nos Sistemas Agrícolas Mediterrânicos, Évora, Portugal, 15-16 de Dezembro de 2005. Revista de Ciência Agrária*, *30*, 400-408.
- Xu, Z., & Howard, L. R. (2012). *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*.

Youssef, O., Mokhtar, G., Abdelly, C., Mohamed, S. N., Mokhtar, Z., & Guido, F. (2013). Changes in volatile compounds and oil quality with malaxation time of Tunisian cultivars of *Olea europea*. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*, 74–81.