



Joana Celina Silva Arruda
Licenciada em Ciências da Nutrição

Estudo da correlação entre parâmetros físico químicos do azeite e a análise sensorial

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Prof^ª. Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos, Professora
Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientadora: Prof^ª. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora
Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof^ª. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof^ª. Doutora Helena Maria Pereira Pinto Dourado e Alvelos
Vogal: Prof^ª. Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018



Joana Celina Silva Arruda
Licenciada em Ciências da Nutrição

Estudo da correlação entre parâmetros físico químicos do azeite e a análise sensorial

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Prof^a. Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos, Professora
Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora
Auxiliar, FCT-UNL

Setembro 2018

Estudo da correlação entre parâmetros físico químicos do azeite e a análise sensorial

Copyright © de 2018 de Joana Celina Silva Arruda, da FCT/UNL e da UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não seria possível a sua concretização e aos quais estarei eternamente grata.

Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida.

Agradeço primeiramente a Deus pela força e por ter guiado cada etapa da minha vida.

Em segundo lugar, o meu profundo agradecimento é para a minha orientadora, Ana Sofia Matos, por todo o seu apoio, motivação, pela dedicação, incansável ajuda e disponibilidade constante.

Em terceiro lugar, um grande obrigada à minha co-orientadora, Ana Lúcia Leitão, por ter aceite a orientação, pelo ânimo e partilhas ao longo desta jornada.

Gostaria de estender os meus agradecimentos à Engenheira Maria de Jesus Caetano pela proposta do tema e por ter permitido a realização do estágio na ASAE, bem como à Engenheira Graça Campos pela partilha de conhecimentos e todo o apoio.

O meu muito obrigada às engenheiras, Margarida Duthoit, Filomena Costa e Margarida Guerreiro por todo o tempo dispendido, pela ajuda no laboratório e prontidão nos assuntos mais incógnitos para mim. Também agradecer ao Engenheiro Raul Botas pela paciência, partilha de conhecimento e experiências.

Agradeço muito ao meu namorado, por toda a compreensão que tem tido comigo, pelo apoio, ânimo, conselhos, amor e amizade, apesar de todas as minhas ausências.

Para finalizar os agradecimentos o meu muito obrigada majestoso aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional, ânimo e mesmos ausentes fisicamente, mostram-se sempre presentes.

Não consegui numa página individualizar, por isso o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

RESUMO

O azeite é a principal gordura da dieta mediterrânea, consagrada património imaterial da humanidade pela UNESCO e o principal constituinte responsável pelas alegações de saúde atribuídas a esta dieta. Possui uma fração insaponificável, que embora minoritária, confere ao azeite características sensoriais e nutracêuticas únicas, que o distinguem das restantes gorduras vegetais, para além de que reúne a proporção ideal de ácidos gordos para o consumo humano. Contudo, esta elevada qualidade é muitas vezes violada devido às fraudes a que o azeite é sujeito com o intuito de aumentar o lucro para o produtor. Este facto faz com que as análises, tanto químicas quanto sensoriais que permitem despistar a existência de fraude, mereçam o foco deste estudo.

Neste estudo foram analisadas 44 variáveis físico químicas e 7 variáveis sensoriais de 349 amostras de azeite nacional que foram remetidas para uma análise multivariada. Foi feita uma caracterização e posterior comparação a nível da correlação de *Spearman* entre as diferentes categorias de azeite. Verifica-se que uma tendência transversal a todos os tipos de azeite é de que as correlações são mais significativas entre as variáveis físico químicas e os descritores sensoriais positivos. As correlações mais significativas dos azeites de qualidade superior (virgem extra e virgem) são entre o perfil esteróico (critério de pureza) e a análise sensorial. À medida que o azeite perde qualidade a tendência é inversa pois as correlações passam a ser mais significativas entre os parâmetros da qualidade e os descritores sensoriais positivos. Tanto o estudo das correlações, como a análise de *clusters*, permitiu concluir que a análise sensorial aplicada ao azeite não pode ser substituída pelos parâmetros de qualidade e de pureza, uma vez que a maioria das correlações são baixas.

Palavras-chave: Azeite, Critérios de Pureza, Critérios de Qualidade, Estatística Multivariada, *Clusters*, Correlação de *Spearman*.

ABSTRACT

Olive oil is the main fat of the Mediterranean diet, consecrated intangible heritage of humanity by UNESCO and the main constituent responsible for health claims attributed to this diet. It has an unsaponifiable fraction, although minority, gives the olive oil unique sensorial and nutraceutical characteristics, distinguishing it from the other vegetable fats, besides which it brings together the ideal proportion of fatty acids for human consumption. However, this high quality is often violated due to the frauds that olive oil is subject to in order to increase profit for the producer. In consequence both chemical and sensorial analyzes that allows to detect the existence of fraud, deserve the focus of this study.

In this study 44 chemical variables and 7 sensory variables of 349 national olive oil samples were analyzed and multivariate analysis approach was used. A characterization and later comparison by the Spearman correlation between the different categories of olive oil was performed. As a general trend observed across all the types of olive oils, the correlations between the physical-chemical variables and the positive sensorial descriptors are more significant. The most significant correlations of higher quality olive oils (virgin extra and virgin) are between the sterol profile (purity criterion) and sensory analysis. As the oil loses quality, the trend is reversed because the correlations become more significant between the quality parameters and the positive sensorial descriptors. Both the correlation study and the *clusters* analysis allowed us to conclude that the sensorial analysis applied to olive oil can not be replaced by the parameters of quality and purity, since most of the correlations are low.

Keywords: Olive Oil, Purity Criteria, Quality Criteria, Multivariate Statistics, *Clusters*, Spearman Correlation

ÍNDICE DE MATÉRIAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento e Motivação	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Metodologia Adotada	3
1.4 Estrutura da Dissertação	4
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
2.1 O azeite.....	5
2.2.1 O Azeite e a Saúde.....	6
2.1.2 Tipos de azeite.....	8
2.1.3 O azeite em Portugal.....	9
2.1.4 O cultivo de Oliveiras.....	10
2.1.5 Variedades da Azeitona.....	11
2.1.5.1 Variedade Arbequina.....	11
2.1.5.2 Variedade Cobrançosa.....	12
2.1.5.3 Variedade Madural.....	12
2.1.5.4 Variedade Cordovil.....	12
2.1.5.5 Variedade Galega.....	13
2.1.5.6 Variedade Maçanilha.....	13
2.1.5.7 Variedade Picual.....	13
2.1.5.8 Variedade Verdeal.....	14
2.1.5.9 Variedade Carrasquenha.....	14
2.1.5.10 Variedade Redondil.....	14
2.1.6 Azeites DOP.....	14
2.1.6.1 Ribatejo.....	15
2.1.6.2 Alentejano interior.....	15
2.1.6.3 Moura.....	15
2.1.6.4 Norte Alentejano.....	15
2.1.6.5 Beira – interior.....	16
2.1.6.6 Trás-os-Montes.....	16
2.1.7 Agricultura e certificação biológica e Azeites de Quinta.....	16
2.1.8 O azeite na cozinha portuguesa.....	16
2.2 Química alimentar.....	17
2.2.1 Enquadramento.....	17
2.2.2 Acidez.....	18
2.2.3 Índice de peróxidos.....	19
2.2.4 K232, k268 e ΔK268.....	20
2.2.5 Fração Saponificável.....	20
2.2.5.1 Ácidos gordos.....	20
2.2.6 Fração insaponificável.....	23
2.2.6.1 Estigmastadienos.....	24
2.2.6.2 Esteróis e uvaol e eritrodiol.....	24
2.2.6.3 Ceras.....	27
2.2.6.4 Pigmentos.....	28
2.2.6.5 Compostos fenólicos.....	28
2.2.7 Soma dos isómeros transoleicos (%) e Soma dos isómeros translinoleicos + translinolénicos.....	29
2.2.8 Ésteres etílicos e metílicos.....	29

2.2.9 Triacilgliceróis com NCE42.....	30
2.2.10 Monopalmitato de 2-glicerilo	30
2.2.11 Trilinoleína.....	30
2.2.12 Solventes Halogenados	31
2.3 Análise Sensorial.....	31
2.3.1 Condições para a prova sensorial.....	35
CAPÍTULO 3 – ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	37
3.1 Introdução.....	37
3.2 Objetivos da aplicação da estatística multivariada.....	37
3.3 Variáveis.....	38
3.4 Conceitos básicos	38
3.5 Coeficientes de correlação - Estatística não paramétrica	39
3.6 Hierarchical Clusters Analysis – HCA.....	40
3.7 Aplicação da estatística multivariada no ramo alimentar	43
CAPÍTULO 4 – METODOLOGIA.....	45
4.1 Análises físico químicas	45
4.1.1 Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE)	46
4.1.2 Classificação das amostras	46
4.3 Análise de dados	47
4.2 Controlo interno.....	48
4.4 Análise Sensorial.....	49
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Classificação das amostras	51
5.2 Correlação entre análise físico química e análise sensorial	52
5.2.1 Azeites virgens extra	52
5.2.2 Azeites virgens	55
5.2.3 Azeites lampantes	58
5.2.4 Azeites	60
5.2.5 Azeites com adição de óleo	62
5.3 Análise Sensorial.....	64
5.3.1 Azeites virgens extra	64
5.3.2 Azeites virgens	65
5.3.3 Azeites lampantes	66
5.3.4 Azeites	68
5.3.5 Azeites com adição de óleo	69
5.4 Hierarchical Clusters Analysis	70
5.4.1 Parâmetros físico químicos e sensoriais	70
5.4.2 Parâmetros físico químicos.....	74
5.4.3 Parâmetros sensoriais	75
5.4.4 Parâmetros físico químicos concordantes com os sensoriais	76
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	79
6.1 Conclusões	79

6.2 Perspectivas Futuras.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	83
ANEXOS.....	95
Anexo I – Métodos para a determinação dos parâmetros físico químicos.....	95
I.1 Determinação da Acidez	95
I.2 Determinação do Índice de Peróxidos	95
I.3 Espectrofotometria no Ultravioleta	96
I.4 Determinação dos estigmastadienos	97
I.5 Determinação dos ácidos gordos e seus ésteres metílicos.....	99
I.6 Determinação dos ésteres etílicos dos ácidos gordos	99
I.7 Determinação dos esteróis, eritrodiol e uvaol	101
I.8 Determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 (Diferença entre o teor obtido por HPLC e o teor teórico)	104
I.9 Determinação das Ceras	105
I.10 Determinação do monopalmitato de 2-glicerilo	106
I.11 Determinação da Trilinoleína	107
I.12 Determinação de Solventes halogenados.....	108
Anexo II – Dendogramas (Análise de <i>clusters</i>)	109
II.1 Variáveis (Físico químicas).....	109
II.2. Variáveis (Sensoriais).....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fórmula Geral dos esteróides	24
Figura 2.2 - Ciclização do esqualeno a cicliartenol	25
Figura 2.3 - Estrutura química dos esteróis presentes no azeite (Akoh & Min, 2002)	26
Figura 3.1 - Exemplo de um dendrograma	42
Figura 4.1 - Etapas da investigação subjacente à dissertação.....	45
Figura 5.1 - Dendrograma das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward	71
Figura 5.2 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 1 e 2 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward	72
Figura 5.3 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 3 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward	72
Figura 5.4 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 4 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward.....	73
Figura 5.5 - Dendrograma das variáveis físico químicas utilizando o algoritmo do método de Ward	74
Figura 5.6 - Dendrograma das variáveis sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward...75	
Figura 5.7 - Dendrograma das amostras com concordância na análise físico química e sensorial	77
Figura I.1 - Espectrofotômetro onde se efetuaram as leituras de absorvâncias.....	97
Figura I.2 - Separação em camada de silicagel dos hidrocarbonetos esteróides.....	98
Figura I.3 - Amostras em repouso para a reação de transesterificação.....	99
Figura I.4 - Amostra após a reação da transesterificação	99
Figura I.5 - Amostra no evaporador rotativo até à secura do solvente.....	100
Figura I.6 - Separação de fases na extração líquido-líquido	102
Figura II.1 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 1 e 2 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite.....	109
Figura II.2 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 3 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite	110
Figura II.3 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 4 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite	111
Figura II.4 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 5 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite	112
Figura II.5 - Dendrograma com o <i>cluster</i> 1 e 2 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite	113

Figura II.6 - Dendrograma com o *cluster* 3 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite 114

Figura II.7 - Dendrograma com o *cluster* 4 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite 115

Figura II.8 - Dendrograma com o *cluster* 5 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite 116

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Ácidos gordos existentes no azeite e respetiva proporção (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991; Codex Alimentarius, 2015)	21
Tabela 2.2 - Proporção de esteróis presentes no azeite (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991).....	27
Tabela 2.3 - Quantidade de ceras nos diferentes tipos de azeite	28
Tabela 2.4 - Classificação dos azeites em função da mediana dos defeitos e da mediana do frutado	34
Tabela 5.1- Percentuais de conformidade do produto declarado com a legislação em vigor	51
Tabela 5.2 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites virgens extra (n=101).....	53
Tabela 5.3 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites virgens (n=133).....	55
Tabela 5.4 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites lampantes (n=67).....	59
Tabela 5.5 -Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites (n=16).....	61
Tabela 5.6 Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites com adição de óleo (n=32).....	63
Tabela 5.7 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites virgens extra	64
Tabela 5.8- Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites virgens (n=133).....	65
Tabela 5.9 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites lampantes (n=67).....	67
Tabela 5.10- Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites (n=16) 69	
Tabela 5.11 Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites com adição de óleo (n=32)	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	<i>Alcohol Acetyl Transferase</i> – Álcool Acetil Transferase
ADH	<i>Alcohol Dehydrogenase</i> – Álcool Desidrogenase
ALA	<i>Alpha-Linolenic Acid</i> - Ácido α -Linolenico
AS	Análise Sensorial
ASAE	Autoridade da Segurança Alimentar e Económica
COI	Conselho Oleícola Internacional
DART	<i>Reflection on the Diet Reinfarction Trial</i> – Reflexões sobre Ensaio de Reinfarto e Dieta
DOP	Denominação de Origem Protegida
EVOO	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> – Azeite Virgem Extra
FAAEs	<i>Alkyl Esters of Fatty Acids</i> – Ésteres Alquílicos de Ácidos Gordos
FAEEs	<i>Ethyl Esters of Fatty Acids</i> – Ésteres Etílicos de Ácidos Gordos
FAMEs	<i>Methyl Esters of Fatty Acids</i> – Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FFA	<i>Free Fatty Acids</i> - Ácidos Gordos Livres
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> - Detetor por Ionização de Chama
FQ	Físico química
GC	<i>Gas Chromatography</i> - Cromatografia Gasosa
GC-ECD	<i>Gas Chromatography - Eletron Capture Detector</i> – Cromatografia Gasosa – Detetor de Captura de Eletrões
HCA	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i> – Análise de <i>Clusters</i> Hierárquica
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LA	<i>Linoleic Acid</i> - Ácido Linoleico
LFQ	Laboratório de Físico Química
LOO	<i>Lampant Olive Oil</i> – Azeite Lampante
LSA	Laboratório de Segurança Alimentar
Md	Mediana dos Defeitos
Mf	Mediana do Frutado
MONICA	<i>Monitor Trends In Cardiovascular Disease</i> – Monitorização de Tendências e Determinantes em Doença Cardiovascular
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acids</i> – Ácidos Gordos Monoinsaturados
NCE42	Número de Carbonos Equivalente a 42
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> - Análise de Componentes Principais

PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> – Ácidos Gordos Polinsaturados
QDA	<i>Quantitative Descriptive Analysis</i> - Análise Quantitativa Descritiva
ppm	Partes Por Milhão
SFA	<i>Saturated Fatty Acids</i> - Ácidos Gordos Saturados
SIAZ	Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa
TAG	Triacilglicerol
VOO	<i>Virgin Olive Oil</i> – Azeite Virgem

LISTA DE SÍMBOLOS

-CH₃	Grupo Metilo
-CHOO	Grupo carbonilo
ω₃	Ómega-3
ω₆	Ómega-6
% m/m	Percentual de massa
ΔK	Varição da extinção específica
ΔK₂₆₈	Varição do valor absoluto da extinção específica
ΣA_{esteróis}	Soma das áreas correspondentes aos esteróis
A	Soma da área de todos os esteróis
A₁	Área do pico correspondente ao eritrodiool
A₂	Área do pico correspondente ao uvaol
A_a	Área do pico correspondente ao padrão interno alfa-colestanol
A_c	Área do pico relativo ao padrão interno (colestadieno).
A_e	Área do pico correspondente do esterol x
A_{es}	Área do pico correspondente a um determinado éster
A_l	Área do pico correspondente ao padrão interno (araquidato de laurilo).
A_p	Área do pico correspondente ao padrão interno (heptadecanoato de metilo)
A_s	Área do pico relativo ao estigmastadieno
A_x	Área do pico correspondente a um determinado éster C ₁₆ ou C ₁₈
c	Concentração do azeite em g/100 mL
C	Carbono
Ch	Concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro
CV_r%	Coefficiente de variação robusto
d	Distância entre objetos
d_{ij}	Distância ou similaridade entre o objeto i e o objeto j
E_λ	Absorvância para a respetiva onda
H	Hidrogénio
H₀	Hipótese nula
H₁	Hipótese alternativa

I2	Iodo
IQR	Desvio padrão robusto
K232	Extinção específica no comprimento de onda 232 nm
k268	Extinção específica no comprimento de onda 268 nm
KI	Iodeto de potássio
Km	Extinção específica no comprimento de onda m
kPa	Quilopascal
Kλ	Extinção específica para o respetivo comprimento de onda
m	Massa da amostra em gramas
M0	Massa da amostra (g).
ma	Massa de padrão interno (alfa-colestanol) adicionado (mg)
mal	Massa de padrão interno (araquidato de laurilo) adicionado (mg)
Mc	Massa de padrão adicionada (mg).
mEq O2/kg	Miliequivalentes de oxigénio por kilograma
Mo	282 g/mol, Massa molar do ácido oleico;
ms	Massa de padrão interno (heptadecanoato de metilo) adicionado (mg).
N	Normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio
n	Tamanho da amostra
Na2S2O3	Tiosulfato de sódio
nm	Nanômetros
O2	Oxigénio
r (ρ)	Coeficiente de correlação de Spearman
ROOH	Grupo hidroperóxido
s	Percurso ótico na célula de quartzo (1 cm)
Vh	Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação mL (mililitros)
Vt	Volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação, tendo em conta o ensaio do branco
xik	Valor da amostra i da variável k
xjk	Valor da amostra j da variável k
ΔNCE42	Diferença entre o NCE42 teórico (Calculado por GC) e experimental (obtido por HPLC)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e Motivação

A oliveira, *Olea europaea* L., é a única espécie da família das *Oleaceae* com fruto comestível, sendo conhecida como a árvore mais antiga cultivada pelo homem (Chliyeh et al., 2014).

O azeite, de entre todos os óleos vegetais comestíveis, é aquele que goza de maior tradição, que é usado à mais tempo e é um dos mais valorizados comercialmente. O facto de ser consumido cru, permite a conservação da sua composição e riquezas naturais (De Lacroix, 2003). Este forma-se durante o desenvolvimento e o amadurecimento da azeitona principalmente nas células da polpa, em pequenas gotículas revestidas por uma membrana protetora que servem como reserva energética para posterior germinação e crescimento de uma nova árvore (Belitz et al., 2009).

A União Europeia ao mesmo tempo que é o maior produtor mundial, também é o maior consumidor mundial, uma vez que representa 80% da produção mundial e consome 70% do azeite consumido mundialmente (De Lacroix, 2003).

Quando o azeite é processado a partir de frutos maduros, frescos e de boa qualidade, o seu aroma é incomparável e delicado. É o único de todos os óleos vegetais que pode ser consumido no estado virgem, sem qualquer processo de refinação, conservando assim todas as suas vitaminas e outros constituintes naturais importantes (Belitz et al., 2009).

O azeite apareceu pela primeira vez na Ásia Ocidental e estendeu-se, rapidamente, por toda a região Mediterrânica. Atualmente mais de 90% da colheita de azeitonas faz-se nesta região, sendo Itália, Espanha, Portugal e Grécia os países com maior produção (Belitz et al., 2009).

Sendo considerado um produto típico da região Mediterrânica, o azeite tem vindo a apresentar uma crescente importância gastronómica, nutricional e económica a nível mundial, pelo que, a garantia da sua qualidade no momento da sua utilização pelo consumidor é um tema fundamental para os países produtores como Portugal, o qual é, atualmente, o quarto maior produtor europeu de azeite (COI, 2017).

Devido à sua importância o *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) é propenso à adulteração com óleos mais baratos e de qualidade inferior (Jabeur et al., 2015) para promover maiores lucros aos supermercados (Bendini et al., 2010).

A realização de análises que possam comprovar a pureza e a qualidade do azeite tem uma enorme importância, no sentido de comprovar que de facto o conteúdo corresponde ao anunciado no rótulo. Neste sentido as três organizações internacionais (Conselho Oleícola

Internacional- COI, União Europeia- EU e Codex Alimentarius Commission) determinaram os parâmetros de qualidade e pureza para o azeite que cumprem esse propósito e incluem: acidez, índice de peróxidos, absorção de luz ultravioleta (K268, Δ K268 e K232), análise sensorial, impurezas insolúveis, composição em ácidos gordos, isómeros trans, ácidos saturados na posição 2 do triacilglicerol, esteróis, eritrodíol e uvaol, ceras, trilinoleína, triglicéridos ECN42 e estigmastadienos (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

A avaliação sensorial (doravante teste de painel) não é simples, e é necessária uma equipa de painelistas treinados. Além disso, o teste de painel é um procedimento dispendioso e lento que nem sempre está à disposição de pequenas e médias empresas e sociedades cooperativas. Em alguns casos, a opinião subjetiva dos painelistas influencia a avaliação geral final também, e podem ocorrer algumas falhas (Aparicio et al., 2000). Por esta razão, os métodos analíticos baseados na identificação e quantificação de voláteis (Benincasa et al., 2003; García-González et al., 2010; Morales et al., 2005; Vichi et al., 2007) são necessários para alcançar a correta classificação de Virgin Olive Oils (VOOs) de maneira rápida e eficiente (Romero et al., 2015).

Porém, não existe até ao momento uma validação completa das metodologias aplicadas para a quantificação de voláteis, pelo que esta determinação poderá estar sujeita a erros significativos que impedem a interpretação sensorial dos dados químicos, razão pela qual nenhum órgão regulador adotou nenhum método proposto como alternativa à avaliação sensorial por teste de painel (García-González & Aparicio, 2010). Este problema analítico surge com as críticas levantadas à qualidade sensorial do EVOO Europeu, bem como ao método standardizado da avaliação sensorial (Frankel et al., 2010).

Por outro lado, a União Europeia, como principal produtor e consumidor de azeite reagiu a essa problemática, financiando novas atividades na validação de métodos analíticos para substituir / complementar a avaliação organoléptica do azeite virgem através do programa de investigação Horizon2020 a decorrer de 2014-2020 (EU Horizon 2020, 2014).

Posto isto, em colaboração com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), laboratório nacional de referência, nasce o interesse em realizar a presente dissertação, com a intenção de investigar estatisticamente quais as correlações que existem entre a análise físico química e a análise sensorial do azeite. Devido ao número de variáveis físico químicas e sensoriais analisadas, torna-se necessário o recurso a um segmento particular da estatística – a estatística multivariada.

1.2 Objetivos

O principal objetivo desta dissertação é o de avaliar de que forma os parâmetros físico-químicos, propostos atualmente para verificar a qualidade e autenticidade do azeite, se relacionam com a análise sensorial e de verificar se é possível fazer a interpretação sensorial dos dados físico-químicos utilizados, através de uma análise estatística multivariada. Pretende-se, através dos dados recolhidos e com base nos diferentes tipos de azeite, compreender de que forma a categoria e os parâmetros físico-químicos influenciam os descritores sensoriais.

Os dados foram recolhidos e analisados pelo Laboratório de Segurança Alimentar (LSA) da ASAE, tendo posteriormente sido disponibilizada a base de dados com as concentrações de cada parâmetro físico-químico e a intensidade de cada parâmetro sensorial.

O objetivo inicial passa por classificar segundo as Diretivas Europeias os azeites presentes na base de dados. Após esta etapa pretende-se correlacionar as análises físico-químicas com a análise sensorial com o objetivo de tentar perceber se o tipo de azeite, nível da categoria e os parâmetros da qualidade e pureza influenciam a intensidade dos descritores sensoriais positivos e negativos. Por fim, segue-se então uma caracterização do azeite por categoria recorrendo à análise de *clusters*.

1.3 Metodologia Adotada

A metodologia adotada compreendeu três grandes blocos, a designar: compilação e validação dos dados, avaliação do grau de correlação entre as variáveis em análise, físico-químicas e da análise sensorial e, por último, aplicação de estatística multivariada pela aplicação da análise de *clusters*. O primeiro bloco compreendeu a compilação e validação de todos os dados analíticos retirados da base de dados da ASAE. Estes foram compilados numa folha de cálculo do excel, onde posteriormente foram validados. Ainda dentro deste bloco, todos os azeites foram reclassificados, quando necessário, tendo em atenção a concordância dos resultados das análises físico-química e sensorial com a legislação vigente. O segundo bloco incidiu sobre a avaliação do grau de correlação entre os parâmetros físico-químicos e a análise sensorial por categoria de azeite. Por se tratar de dados com uma variabilidade significativa, optou-se por aplicar a correlação de *Spearman*, não paramétrica. Por fim realizou-se a análise de *clusters* para definir grupos homogêneos de acordo com os parâmetros físico-químicos e a análise sensorial.

1.4 Estrutura da Dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos. O primeiro capítulo visa justificar a necessidade da realização deste estudo, assim como o objetivo a ser alcançado no final deste e a metodologia aplicada.

O segundo e terceiro capítulo (fundamentos teóricos do azeite e estatística multivariada, respetivamente), também geralmente designados de revisão bibliográfica, expõem e fundamentam os conceitos teóricos presentes ao longo de toda a dissertação, que nomeadamente assentam sobre as áreas do azeite, da química alimentar e da estatística multivariada.

O quarto capítulo apresenta a metodologia seguida, quer pela ASAE na análise química, quer pela análise dos dados, realizada pela autora da dissertação.

No quinto capítulo são apresentados os resultados obtidos através da sequência de processos descritos na metodologia, e respetiva análise e conclusão aos mesmos.

Por fim, no sexto e último capítulo são apresentadas as conclusões relativamente ao trabalho realizado. São ainda apresentadas algumas sugestões de melhorias em trabalhos futuros com este tema.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 O azeite

O azeite é o óleo obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), com exclusão dos óleos obtidos utilizando dissolventes ou processos de reesterificação ou provenientes de qualquer mistura com óleos de outro tipo (Codex Alimentarius, 2013; Visioli et al., 2001).

Este óleo é composto essencialmente por triacilgliceróis (99%) e secundariamente por ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis e uma matriz de lípidos como hidrocarbonetos, esteróis, álcoois alifáticos, tocoferóis e pigmentos. Uma infinidade de compostos fenólicos e voláteis também estão presentes, sendo que alguns destes compostos contribuem para o caráter único do óleo (Gunstone, 2011).

Do ponto de vista químico, pode-se identificar no azeite duas frações, dependendo do comportamento na presença de aquecimento e soluções fortemente alcalinas (soluções concentradas de KOH ou NaOH), sendo estas a fração saponificável, que representa 98-99% do seu peso total, é composta por substâncias que formam sabão nas condições acima descritas e a fração insaponificável, que representa os 1-2% restantes do peso e é composta de substâncias que não formam sabão nas condições acima (Gunstone, 2011).

A fração saponificável tem uma composição específica de ácidos gordos, onde a razão entre ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados é perfeitamente equilibrada e considerada a ideal para o consumo humano. Os restantes 1-2% representam a fração insaponificável que inclui compostos que estão presentes em pequenas quantidades, mas que ajudam a tornar o azeite único (Ammar et al., 2014; Méndez & Falqué, 2007).

A qualidade de um azeite depende de vários fatores, nomeadamente da variedade das azeitonas utilizadas, do seu estágio de amadurecimento, condições ambientais, práticas culturais, método de extração e condições de armazenamento (Matos et al., 2007).

Entre os fatores intervenientes na qualidade a variedade é considerada a de maior importância influenciando também as características sensoriais. A sua importância deve-se às enzimas geneticamente definidas que estão envolvidas na lipoxigenase, que por sua vez é a principal via de formação de compostos de aroma (Manai et al., 2008). São conhecidas cerca de 1275 variedades de azeitona, mas deste total o número de variedades de importância comercial é reduzido, no referente a produção e consumo (Aparicio & Luna, 2002) e dessa forma procura-se aprimorar conhecimentos, principalmente no que diz respeito à produção de azeitonas para extração de azeites monovarietais para padronizar as suas propriedades.

O azeite é um dos mais antigos óleos vegetais conhecidos e é único entre eles, uma vez que pode ser consumido como um sumo de fruta chamado azeite virgem (Lucas et al., 2011).

O azeite tem constituintes aromáticos característicos que o distinguem dos outros óleos

vegetais comestíveis. Os sabores do azeite virgem são gerados por constituintes voláteis presentes em concentrações extremamente baixas (Ostlund, 2002).

Os fenólicos são importantes não só do ponto de vista nutricional, mas também em termos de qualidade sensorial. Portanto, o aumento da procura por produtos de elevada qualidade nos últimos anos pode ser atribuída não só aos seus potenciais benefícios para a saúde, mas também às suas propriedades organolépticas únicas. Os fenólicos do VOO são responsáveis também pelas notas sensoriais amargas e picantes deste óleo (Inarejos-Garcia et al., 2009), que são atributos comuns e desejáveis quando presentes de baixa a moderada intensidade, mas são rejeitados por consumidores quando presentes em elevadas concentrações (León et al., 2011).

A obtenção do azeite envolve, essencialmente, quatro fases: a apanha, a trituração, a batida e a extração (Ramón et al., 2003).

A apanha é uma etapa importante, na qual depende a qualidade do produto final, uma vez que durante o amadurecimento da azeitona ocorrem alterações na sua composição química que posteriormente influenciam as propriedades do azeite. Desta forma, é desejável que as azeitonas sejam sãs, encontrem-se em estado de maturação ótimo e sejam colhidas diretamente da árvore (Aparício & Harwood, 2003).

A etapa da trituração da azeitona visa libertar os óleos armazenados nas gotículas da polpa. Após este processo ocorre a batida que possibilita que estas gotículas se unam em gotas maiores até constituírem uma fase líquida contínua (Aparício & Harwood, 2003).

Por fim, os constituintes líquidos e a pasta da azeitona são separados por prensagem ou centrifugação. Na primeira são usadas prensas sujeitas a uma elevada pressão que separam o azeite e a água da pasta sólida. O azeite é seguidamente separado da água por processos de decantação. A segunda é uma técnica recente, onde o movimento de rotação a alta velocidade permite separar o azeite das restantes partes (Aparício & Harwood, 2003).

O azeite, após extraído, representa o sumo de azeitonas, que devem estar em perfeitas condições de maturação e ser provenientes de oliveiras sadias, cujo processamento tenha sido efetuado logo após a colheita para evitar a alteração das suas características (Aparício & Harwood, 2003). A prensagem rapidamente a frio das azeitonas permite minimizar a ativação das lipases e a consequente degradação de triglicéridos, que por sua vez influencia o grau de acidez (Visioli et al., 2001).

2.2.1 O Azeite e a Saúde

O azeite é um produto economicamente importante na maioria dos países mediterrânicos, onde a sua produção tem longas raízes históricas. O interesse por este produto recentemente acentuou-se, tanto dentro como fora da região Mediterrânica, por vários estudos que se concentraram em demonstrar seus efeitos benéficos para a saúde humana e suas amplas aplicações culinárias (Boskou, 2011).

Numerosos estudos médicos, a citar o estudo pioneiro que envolveu sete países e que foi conduzido por Michel Keys, em 1950, à semelhança do estudo MONICA (Monitorização Multinacional de Tendências e Determinantes em Doença Cardiovascular), o estudo DART (Reflection on the Diet Reinfarction Trial), entre outros demonstraram que o azeite é um dos ingredientes mais importantes da dieta mediterrânica e está associado à redução de doenças cardiovasculares e certos tipos de doenças cancerígenas (Burr, 2001; Keys et al., 1986; Tunstall-Pedoe et al., 1994).

Os efeitos benéficos da dieta tradicional mediterrânica à saúde humana têm sido amplamente divulgados. Esta dieta reduz o risco de várias doenças, principalmente aquelas que contêm um componente inflamatório tal como doença cardiovascular, certos tipos de cancro, diabetes, síndrome metabólica, artrite e Doença de Alzheimer (Lucas et al., 2011; Estruch et al., 2013).

O EVOO representa a principal fonte de gorduras na bacia do Mediterrâneo, uma vez que possui efeitos positivos na saúde humana, em especial para evitar cancro da mama e do cólon, e no que diz respeito à diabetes por doenças inflamatórias e auto-imunes (Visioli et al., 2001). Este papel protetor do EVOO é o resultado da sua composição específica, incluindo uma alta proporção de gorduras monoinsaturadas (ácidos oleicos), uma presença equilibrada de ácidos gordos polinsaturados e de componentes menores, como tocoferóis, compostos fenólicos, esteróis e sabores (Owen et al., 2000).

Recentemente foi dada especial atenção à fração fenólica do VOO, uma vez que o consumo dietético de VOO a longo prazo proporcionaria compostos fenólicos que poderiam atenuar a resposta inflamatória que o corpo humano sofre após a ingestão de alguns alimentos e poderia reduzir o risco de doenças inflamatórias crónicas (Lucas et al., 2011).

A fração insaponificável do azeite é principalmente representada por fitoesteróis, que por sua vez exercem efeitos apreciáveis sobre a saúde devido às suas propriedades anticarcinogénicas e hipocolesterolémicas (Ostlund, 2002).

Para além de outros preciosos e valiosos insaponificáveis, como álcoois alifáticos e triterpénicos, esteróis (principalmente β -sitosterol), hidrocarbonetos (esqualeno), compostos voláteis, tocoferóis, principalmente α -tocoferol, pigmentos (clorofila e carotenóides) e antioxidantes que atribuem ao azeite um valor biológico excepcional, classificando-o como alimento funcional (Šarolić et al., 2014).

Numa dieta equilibrada a relação polinsaturados: monoinsaturados: saturados deverá ser de 1:2:1. O azeite contém uma proporção de 0,5:5:1 e os restantes óleos vegetais 5:2:1. A estabilidade e resistência do azeite contra a oxidação deve-se ao facto do grau de oxidação do ácido linoleico ser dez vezes maior do que o ácido oleico (Viola, 2003). As evidências atuais demonstram que a principal fonte de gordura deve ser de ácidos gordos monoinsaturados, os quais estão maioritariamente presentes no azeite (Šarolić et al., 2014).

O azeite virgem é considerado um alimento funcional devido às substâncias ativas que

contém, nomeadamente os antioxidantes, que diferenciam significativamente o azeite em relação aos outros óleos vegetais. Os antioxidantes mais importantes do azeite são os compostos fenólicos, uma vez que são fundamentais para aumentar a estabilidade do azeite à deterioração oxidativa e afetam as propriedades sensoriais (Bendini et al., 2007).

O azeite contém tocoferóis, um antioxidante fenólico natural de origem terpénica, e acredita-se que previne a oxidação das membranas lipídicas pelos radicais livres e assim retarda o processo de envelhecimento (Pine, 1994). Para além disso os tocoferóis também defendem o corpo contra ataques de radicais livres, prevenindo a aterosclerose, doenças de pele e certas doenças cancerígenas (Hudson & Lewis, 1983).

2.1.2 Tipos de azeite

Existem duas categorias principais de azeite. A legislação portuguesa em vigor, à semelhança das normas alimentares internacionais, classifica os azeites em virgens que são obtidos do fruto da oliveira exclusivamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, sob condições, particularmente condições térmicas, que não conduzam a alterações no azeite e que não foram submetidos a nenhum tratamento além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Ou simplesmente com a designação de azeite que é constituído por azeite refinado e azeite virgem. Da azeitona também pode ser obtido o óleo de bagaço de azeitona que por sua vez são óleos obtidos por tratamento do bagaço de azeitona (subproduto da produção de azeite) com solventes, exceto solventes halogenados ou outros tratamentos físicos com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outros tipos (Codex Alimentarius, 2013; Regulamento (CE) N.º 1234/2007 do Conselho de 22 de Outubro de 2007, 2007).

De acordo com o Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, e suas alterações para se definirem as categorias de azeite é necessário efetuar-se uma análise química e organoléptica aos mesmos. Desta forma, o azeite virgem é classificado quanto a sua qualidade, podendo integrar as categorias de “azeite virgem extra” ou “azeite virgem”, ambas comercializadas após a extração e “azeite lampante” de menor qualidade e que terá que ser submetido às operações de refinação. Esta operação permite eliminar as características indesejáveis, como acidez elevada ou cheiros e sabores anómalos. O azeite refinado é depois enriquecido com um dos azeites virgens de melhor qualidade (virgem ou virgem extra), resultando o terceiro tipo comercial designado simplesmente por “azeite”. A categoria “azeite” é sempre constituída por loteamento de azeite refinado, não comercializável, com azeite virgem extra ou azeite virgem.

Ainda segundo o Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 entende-se por óleo de bagaço de azeitona bruto a gordura remanescente extraída do bagaço da azeitona (composto por cascas, resíduos da polpa e fragmentos do caroço da azeitona) por tratamentos com solventes ou a

processos físicos. Este por sua vez pode sofrer refinação, originando o óleo de bagaço de azeitona refinado. O loteamento do óleo de bagaço de azeitona refinado com azeites virgens origina o óleo de bagaço de azeitona. Assim as categorias que podem ser encontradas à venda são o azeite virgem extra, o azeite virgem, azeite e óleo de bagaço de azeitona.

2.1.3 O azeite em Portugal

A Bacia Mediterrânica é por excelência a região produtora de azeite, sendo aí que se concentra a maior parte do património olivícola mundial, e que representa uma enorme importância na economia rural, no ambiente e na fixação de populações em territórios de baixa densidade como são algumas dessas regiões (De Lacroix, 2003).

As excelentes condições edafoclimáticas de Portugal tornaram a olivicultura numa cultura estratégica para a agricultura portuguesa, ocupando a oitava posição no ranking mundial dos produtores de azeite. As suas principais regiões de produção são o Alentejo e Trás-os-Montes, com alguma supremacia para o Alentejo em termos de área (Alentejo – 41,7% e Trás-os-Montes – 20,8%) (GPP, 2007), mas devido a um clima mais favorável, menor ataque de pragas e doenças, e à utilização de diferentes cultivares de oliveira, Trás-os-Montes, é tradicionalmente, a região com a melhor qualidade do azeite no País (Ferreira, 2014). As regiões da Beira Interior e Ribatejo e Oeste posicionam-se na segunda linha do ranking da produção nacional, com uma ocupação de, respectivamente, 17,9% e 11,3% (GPP, 2007).

Foram produzidos mundialmente 2 539 000 toneladas de azeite na campanha de 2016/2017, o que representa uma redução de 20% (637 500 toneladas a menos) face à campanha de 2015/2016. Os 17 países membros do COI, a citar a União Europeia (Bélgica, Espanha, França, Grécia, Itália, Portugal, Reino Unido), Israel, Líbia, Marrocos, Tunísia, Albânia, Argentina, Argélia, Croácia, Egito, Iraque, Irão, Jordânia, Líbano, Montenegro, Síria e Turquia) foram detentores de 93% da produção mundial, sendo os responsáveis desta forma pela produção de 2 350 500 t. Aproximadamente metade da produção mundial é assegurada pelos países Europeus, que produziram 1 747 500 t de azeite, um quarto a menos da produção da campanha anterior. Portugal é o quarto maior produtor Europeu, sendo que na campanha acima mencionada produziu 69 400 t, superado apenas pela Espanha, que é o maior produtor mundial de azeite (1 286 600 t) seguido pela Grécia (195 000 t) e por último a Itália (182 300 t) (COI, 2017).

Segundo dados do SIAZ (Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa), (2018) na campanha 2017/2018 verificou-se um aumento excecional em relação à campanha anterior, uma vez que a produção foi de aproximadamente 120 000 t de azeite, sendo a maior parte produzida no Alentejo (78,3%), seguida no Norte (11,3%), Lisboa e Vale do Tejo (5,2%), centro (4,3%) e por último no Algarve (0,9%). Contudo o seu consumo diminuiu para metade em 2017 (44 119 t) em relação ao ano anterior (81 967 t), indicando a plena autossuficiência de Portugal neste produto, uma vez que a quantidade produzida excede a quantidade consumida.

A indústria do azeite é um setor que movimenta milhões e por isso representa uma enorme importância para a economia portuguesa, uma vez que se trata do segundo produto agroalimentar que Portugal mais exporta, logo a seguir aos vinhos, mesmo com vizinhança do maior produtor mundial, a Espanha (Cintra, 2014).

2.1.4 O cultivo de Oliveiras

A oliveira é uma das mais antigas plantas cultivadas e a única espécie dentro da família Oleaceae com frutos comestíveis. A domesticação ocorreu em torno de 6.000 a 5.000 a.C., provavelmente a partir de azeitonas silvestres (*Olea europaea* L. subsp. *Europaea* var. *sylvestris*). Devido à presença de brotos latentes abundantes na madeira, a azeitona é fácil de propagar e isso pode ter contribuído para o seu cultivo nos tempos antigos (Zohary & Spiegel-Roy, 2016). Embora a oliveira tenha origem na Ásia tem sido cultivada há mais de 3000 anos nos países mediterrânicos, onde grande parte da cultura da oliveira é usada para fazer azeite. A azeitona é uma cultura importante em termos de valor comercial e do papel que desempenha na economia rural da região do Mediterrâneo, com seus milhões de produtores (Gonzalez-Andujar, 2009).

Supõe-se que a sua expansão por toda a bacia do Mediterrâneo tenha ocorrido desde a península da Anatólia, Chipre, Creta e Egito, a princípio pelos gregos e fenícios, depois pelos cartagineses, romanos e árabes (López-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). Portanto, a oliveira está ligada à história de algumas das civilizações mediterrâneas mais antigas. Mais tarde, na época das grandes viagens transoceânicas nos séculos XV e XVI, espalhou-se pelas Américas e, mais recentemente, foi introduzido e cultivado na África do Sul, China, Japão e Austrália (Civantos, 2008).

Na bacia do mediterrâneo encontra-se 97% da área de cultivo global (aproximadamente 10,5 milhões de hectares), 0,85% nas Américas, 1,5% na Ásia e 0,01% na Oceania (Chliyah et al., 2014). A azeitona é cultivada em uma ampla variedade de solos e pode tolerar uma ampla gama de condições físico químicas. Por exemplo, a azeitona é resistente à seca, tolerante ao calor e bem adaptada a uma ampla faixa de pH do solo (5,5 a 8,5). Da mesma forma, a azeitona tem alta tolerância à salinidade (Aragüés et al., 2010) e a um excesso de boro e cloro (Navarro & Parra, 2008). No entanto, as oliveiras são sensíveis a solos mal oxigenados que podem ocorrer, por exemplo, após inundações persistentes. A tolerância à inundação é dependente de cultivares e está associada à capacidade de produzir raízes adventícias perto da superfície do solo (Aragüés et al., 2004). Em geral, a tolerância à inundação é menor em árvores jovens e durante a fase de crescimento ativo da árvore (Navarro & Parra, 2008; Sánchez-Hernández et al., 1998).

A área oleícola de Portugal é de 352 000 ha, sendo que a principal área de cultivo é o Alentejo, que representa 50% da área olivícola nacional seguida por Trás-os-Montes (22%), Centro (18%); Ribatejo (7,7%) e Algarve (2,3%). Cerca de 97,5% da superfície total é utilizada para o cultivo de oliveira para azeite (Arias-Calderón et al., 2017).

A olivicultura é uma atividade agrícola importante em Portugal, representa 95,5 milhões de euros, com um peso de 1,36% no valor da produção agrícola. O Setor oleícola em Portugal emprega 1431 trabalhadores (1,6% do total da indústria agroalimentar), possui mais de 495 lagares, 12 refinarias de azeite e 17 unidades que laboram o bagaço de azeitona (Arias-Calderón et al., 2017).

As principais variedades portuguesas de oliveira são a “Galega Vulgar” que é aquela predominante no país (60%), seguida da “Cobrançosa”, autóctone da região de Trás-os-Montes, contudo podem ser encontradas em todo o país, a “Carrasquenha de Elvas” da região do Alentejo aonde se cultiva também a variedade “Cordovil de Serpa”, a “Verdeal de Trás-os-Montes” e a “Madural” são cultivadas nas regiões de Trás-os-Montes (Arias-Calderón et al., 2017).

Relativamente ao rendimento médio de uma oliveira em termos de azeitonas, este é de 20 kg, o suficiente para obter 4 litros de azeite (Cintra, 2014).

2.1.5 Variedades da Azeitona

É necessário conhecer as características das variedades de azeitonas para otimizar a qualidade de um azeite, uma vez que a variedade influencia a composição em ácidos gordos (Cunha et al., 2006), o teor de fenólicos e tocoferóis (Boskou, 2011) e o desenvolvimento de compostos de aroma (Manai et al., 2008). Para além de que as variedades adaptam-se de maneira diferente às condições climáticas e práticas agrícolas, o que pode alterar a qualidade do azeite (Kalua et al., 2007).

Em Portugal cultivam-se inúmeras variedades, sendo que Leitão et al. (1986) descreveu 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal.

Por considerar importante, abaixo listam-se as características das principais variedades de azeitonas cultivadas no nosso país.

2.1.5.1 Variedade Arbequina

Variedade de origem Espanhola, tem a sua principal área de cultivo na Catalunha, embora também já se encontre um pouco por todo o mundo, em especial na Argentina (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

A árvore da arbequina tem dimensão reduzida, adapta-se a terrenos pobres e apresenta alta resistência ao frio. A azeitona tem forma ovalada, quase redonda, com uma baixa relação polpa/caroço e pequeno tamanho, o que leva a dificuldades na colheita mecanizada. É uma variedade muito apreciada pela sua precocidade, elevada produtividade e bom rendimento de gordura (cerca de 20,5%) (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

Quando começa a colheita, as azeitonas são muito verdes e isso reflecte-se sobre as características organolépticas do azeite. Normalmente, estas azeitonas nunca chegam à maturação total. Os azeites obtidos têm atributos bem definidos, com sabores mais verdes, amargos e picantes, no início da colheita, e mais doces no final, sendo utilizados especialmente para o tempero de saladas, verduras (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

2.1.5.2 Variedade Cobrançosa

Esta variedade é cultivada principalmente no nordeste de Portugal, em Trás-os-Montes, mas, nos últimos anos, o seu plantio tem vindo a ser alargado a todo o país. A oliveira Cobrançosa adapta-se bem a climas severos, seja ao frio ou ao calor, e apresenta boas condições para a colheita mecânica. O fruto é rico em polifenóis, por isso é resistente à oxidação, e a sua polpa tem uma textura consistente, pelo que, além da produção de azeite, costuma ser processado para conserva e azeitona de mesa. O rendimento em azeite varia entre os 18 a 22%, o qual, quando processado num estado inicial de maturação do fruto, tem um sabor ligeiramente amargo e picante, que passa a doce e suave, à medida que avança o estado de maturação (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

2.1.5.3 Variedade Madural

A Madural, também designada Negral, constitui uma das variedades mais raras produzidas em solo português, embora seja uma das usadas, essencialmente no azeite de Trás-os-Montes (AFGalimentar, 2018).

Apresenta características como um baixo teor em ácido oleico e um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados (Matos et al., 2007).

2.1.5.4 Variedade Cordovil

Este cultivar é característico da Beira Interior (Castelo Branco) e do Alentejo (Serpa). A oliveira da Cordovil dá fruto apropriado para colheita por vibração. O seu azeite é especialmente rico em ácido oleico, muito utilizado também em conserva (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

2.1.5.5 Variedade Galega

É uma variedade exclusivamente portuguesa, pelo que, fora do país, é muitas vezes referida como a azeitona portuguesa. É a variedade mais difundida em Portugal, muito frequente nas Beiras, Alentejo e Algarve (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

Consegue-se distinguir das restantes variedades pelo seu pequeno calibre, de cor verde médio com alguma pruína, e preto intenso quando madura. O caroço elíptico com uma superfície lisa tem estrias pouco vincadas e sabor característico. Oferece resistência ao desprendimento da oliveira, pelo que dificulta a apanha mecânica. É utilizada em azeite, embora o rendimento não seja elevado, e em conserva. Os azeites são, de um modo geral, espessos na boca, muito doces, com frutado ligeiro e notas suaves de verde folha e marcadas de maçã madura e também de frutos secos (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

2.1.5.6 Variedade Maçanilha

A variedade Maçanilha Algarvia é conhecida pela sua tolerância ao frio, à seca e à salinidade. A capacidade de enraizamento, a entrada em produção, a época de maturação e a produtividade situam-se, em geral, na média das escalas respectivas (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

Os seus frutos são pouco resistentes ao desprendimento, o que contribui para a colheita mecanizada. Pode ser utilizada tanto para obtenção de azeite, como para azeitona de mesa, verdes ou maduras, devido ao tamanho e calibre dos seus frutos. A separação da polpa do caroço é difícil (AFGalimentar, 2018).

2.1.5.7 Variedade Picual

A mais abundante variedade de azeitona no mundo, devido à sua forte implantação em Espanha, de onde é originária, sendo 85% da região de Jaén. O seu nome inspira-se no fruto, que possui uma forma em pico. Esta variedade apresenta particular tolerância ao frio, salinidade e excesso de humidade no solo. A entrada em produção é precoce (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

Apresenta uma alta produtividade para azeite (cerca de 22%), o qual é de qualidade mediana e ligeiramente amargo, devido aos polifenóis presentes (CEPAAL, 2013; Companhia do Azeite, 2013).

2.1.5.8 Variedade Verdeal

A azeitona Verdeal adapta-se bem praticamente a todo o solo português. É frequente tanto no Alentejo (Verdeal Alentejana) como em Trás-os-Montes (Verdeal Transmontana). Amadurece tardiamente. É utilizada para conserva, em verde ou triturada, mas principalmente para a extração de azeite, com um bom rendimento. O azeite resultante é bastante fino, com um frutado marcante, persistente, com verde de folha e sabor bastante amargo e picante (AFGalimentar, 2018).

2.1.5.9 Variedade Carrasquenha

Esta variedade destina-se tanto a produção de azeite como à obtenção de azeitona de mesa verde, sendo que possui um rendimento médio a elevado de azeite de boa qualidade (AFGalimentar, 2018).

2.1.5.10 Variedade Redondil

A variedade Redondil possui um elevado rendimento em azeite de boa qualidade e é muito rico em ácido oleico. Destina-se também a azeitona de mesa, muito apreciada pelo seu tamanho. A separação da polpa do caroço é fácil (AFGalimentar, 2018).

2.1.6 Azeites DOP

DOP é a abreviatura de Denominação de Origem Protegida que consiste na forma administrativa mais conveniente para proteger os azeites virgens nacionais pela sua origem e, simultaneamente valorizá-los tanto comercialmente como qualitativamente. Consiste em todos os azeites que possuem origem numa área geográfica delimitada com solos e clima característicos, cuja elaboração deverá atender a um conjunto de regras estipuladas num caderno de especificações e obrigações, sendo produzidos apenas com azeitonas de certas variedades e de acordo com a respetiva proporção, devem atender às condições de apanha e transporte para o lagar, às condições de laboração e acondicionamento e às características do produto final (Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006, 2006).

Atualmente, existem seis regiões DOP em Portugal: Moura, Trás-os-Montes, Beira Interior (integram dois tipos regionais, os Azeites da Beira Alta e os Azeites da Beira Baixa), Norte Alentejano, Alentejo Interior e Ribatejo (Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006, 2006).

2.1.6.1 Ribatejo

Os azeites ribatejanos são provenientes essencialmente das variedades Galega (mínimo 55%) e Cobrançosa (máximo 45%), sendo proibida a adição da variedade picual (Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006, 2006). Tratam-se de azeites ligeiramente espessos, frutados, com cor amarela ouro, por vezes ligeiramente esverdeados com um sabor marcadamente doce e suave (Casa do Azeite, 2018).

2.6.1.2 Alentejano interior

São utilizadas as variedades Cordovil de Serpa, Galega e a Cobrançosa que conferem ao azeite uma cor amarela dourada ou esverdeada, um aroma frutado suave de azeitona madura ou verde ou ainda de outros frutos como maçã, figo, o que gera uma grande sensação de doce (Casa do Azeite, 2018).

2.1.6.3 Moura

Os azeites desta região, situada na margem esquerda do rio Guadiana, são obtidos de azeitonas da variedade Verdeal (com máximo de 15 a 20%), Cordovil (35 a 40%) e Galega. Como principais características dos azeites desta região temos a baixa ou muito baixa acidez, cor amarela esverdeada, com aroma e sabor frutado, amargo e picante (Casa do Azeite, 2018; AFGalimentar, 2018).

Os azeites de Moura são ricos em ácidos gordos monoinsaturados. Na sua extração apenas se utilizam azeitonas colhidas de árvores em plena maturação (Freitas, 2013).

2.1.6.4 Norte Alentejano

Os azeites do Norte Alentejano, provenientes de algumas zonas de Évora, Estremoz, Borba e Reguengos de Monsaraz até Elvas, Campo Maior e Portalegre São obtidos através das variedades Galega (mínimo 65%), Blanqueta (máximo de 5%), Cobrançosa (máximo de 10%), Azeiteira (máximo de 5%), Carrasquenha (máximo 5%) e Redondil (máximo 5%) (Regulamento (CE) N.º 708/2005 da Comissão de 10 de Maio de 2005, 2005). São azeites de baixa a muito baixa acidez, ligeiramente espessos, frutados, com cor amarelo ouro, por vezes esverdeada com sabor e aroma suave (Casa do Azeite, 2018).

2.1.6.5 Beira – interior

O azeite é obtido das variedades Galega, Cobrançosa e Carrasquenha. Sendo que as características que mais o definem são a cor amarela clara ou esverdeada e o sabor a fruto fresco e bastante suave (Casa do Azeite, 2018).

2.1.6.6 Trás-os-Montes

As variedades Verdeal, Madural, Cobrançosa e Negrinha do Freixo são utilizadas para a obtenção dos azeites transmontanos, cuja região é delimitada pelo distrito de Bragança, que engloba Alfândega da fé, Vila Flor, Mirandela até Valpaços e Murça, os quais possuem um cheiro e sabor a fruto fresco, por vezes amendoado. Notável sensação verde, amargo e picante (Casa do Azeite, 2018).

2.1.7 Agricultura e certificação biológica e Azeites de Quinta

Os azeites de agricultura biológica são todos aqueles provenientes de olivais que sofrem um tratamento agrícola de acordo com o modo de produção biológica regulamentada pela União Europeia. Os requisitos da produção biológica definidos consistem em desenvolver a fertilidade do solo e, a partir daí melhorar a qualidade e a quantidade das produções obtidas. A aplicação de fertilizantes e de pesticidas está limitada a um conjunto de produtos definidos pela Comissão Europeia. A rotulagem destes azeites deve conter, para além da informação obrigatória constante nos outros azeites, a menção "Agricultura Biológica", "Sistema de Controlo CE", indicação da entidade de controlo e certificação e, facultativamente o selo comunitário de agricultura biológica (CONFAGRI, 2009a).

Os azeites de quinta são aqueles nas quais todas as operações desde o cultivo da Oliveira até ao acondicionamento do azeite são efetuadas na área geográfica de exploração agrícola (CONFAGRI, 2009a).

2.1.8 O azeite na cozinha portuguesa

O azeite, além de elemento central na dieta mediterrânica, é um clássico da cultura gastronómica portuguesa. Desde os pratos mais simples até aos mais sofisticados, o azeite é culturalmente a fonte de gordura mais utilizada.

Cada categoria possui uma aplicação culinária específica, sendo os azeites virgens extra melhor empregues em cru, para conservar as propriedades, como tempero ou para finalizar pratos, o azeite virgem é mais adequado para os pratos que requerem alguma cozedura e o azeite

refinado para fritar ou para submeter a temperaturas mais elevadas, uma vez que as características não se alteram a menos de 220°C (AFGalimentar, 2018).

Um azeite com sabor a verde enaltece na perfeição a suavidade dos vegetais, para potenciar os aromas da carne o melhor é juntar-lhe um azeite mais picante. Para adicionar às massas, o mais aconselhado são os azeites mais macios e suaves, para pratos mais leves, um azeite amendoado é uma ótima aposta, os azeites suaves são perfeitos para adicionar a molhos ou até mesmo para a confeção de maionese e por último e para não roubar a subremacia do doce, um azeite leve e neutro é o melhor para ser empregue na pastelaria (AFGalimentar, 2018).

Existe um peixe que parece ter nascido para ser acompanhado, obrigatoriamente, pelo azeite que é o bacalhau. As mil e uma maneiras e feitios de cozinhar o bacalhau fazem do azeite um ingrediente inseparável da cozinha portuguesa. Pratos como o bacalhau à brás, à Gomes de Sá, à Lagareiro, Espiritual, à zé do Pipo e tantos outros são bons exemplos que associam o bacalhau ao azeite. Este tipo de pratos de sabor mais pronunciado devem ser trabalhados com um azeite de sabor e aroma mais intenso para intensificar o sabor dos alimentos, é o caso também dos escabeches, açordas e caldeiradas (Correia, 2008).

2.2 Química alimentar

A composição exata do azeite depende de fatores agronómicos, tais como, rega, fertilização, poda, práticas de proteção e produção integrada, colheita, transporte e armazenamento da azeitona, de fatores geográficos e climáticos, da variedade e do estado de maturação da azeitona, de fatores relacionados com o método da extração e das condições de transporte e armazenamento do azeite (Simões-Lopes et al., 2009).

Quimicamente o azeite é composto por duas frações, uma saponificável ou maioritária e outra insaponificável ou minoritária (Gouveia, 1995).

2.2.1 Enquadramento

A ciência dos alimentos é um ramo das ciências biológicas e um tópico interdisciplinar que envolve basicamente microbiologia, química, biologia e engenharia. A química de alimentos é um dos tópicos principais da ciência dos alimentos, tratando da composição e das propriedades dos alimentos, bem como das transformações químicas que eles sofrem durante a manipulação, processamento e armazenamento. A química de alimentos está diretamente relacionada à química, à bioquímica, à botânica, à zoologia e à biologia molecular (Fennema, 1996).

O conhecimento multidisciplinar destas áreas tem permitido grandes avanços na garantia da qualidade alimentar no sentido de melhorar as alterações sofridas durante a manipulação, processamento e armazenamento. Desta forma a cor, a textura, o sabor, a segurança e o valor

nutricional dos alimentos têm correspondido mais às exigências e às expectativas do consumidor (Fennema, 1996).

Quanto à constituição do azeite, e para cimentar o que foi mencionado num ponto anterior (onde se falam das características do azeite), tem-se que, o azeite é um alimento rico em ácidos gordos monoinsaturados que fornece 9 kcal/g e é basicamente uma mistura de triacilgliceróis (compostos lipídicos formados por uma reação de esterificação de três ácidos gordos com uma molécula de glicerol), com alguns ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis e alguns constituintes não saponificáveis. O teor de ácidos gordos varia com o tipo de azeite e é um critério importante na qualidade do mesmo, sendo a sua principal composição em ácido oleico (Gutierrez & Carretero, 2009).

2.2.2 Acidez

A acidez pode ser definida como a quantidade de hidróxido de potássio (KOH) necessária para neutralizar os ácidos gordos livres presentes em 1 g de amostra. Desta forma, representa a quantidade de ácidos gordos livres (Codex Alimentarius, 2001). Trata-se de um parâmetro negativo, pois a partir de certos limites (2%), o azeite deixa de ser apto para consumo imediato e tem de ser refinado (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

A acidez de um azeite é consequência da rutura dos triacilgliceróis, devido a uma reação de hidrólise, com formação de ácidos gordos livres. Os fatores que levam a um aumento da acidez do óleo são por exemplo a infestação do fruto por insetos (moscas), atrasos na colheita do fruto e na sua extração, frutos doentes devido a fungos, contacto prolongado entre água e óleo vegetal após extração e métodos de extração defeituosos (Kiritsakis, 1998).

Este parâmetro do azeite está relacionado com a natureza e qualidade da matéria-prima, com o processamento e conservação, assim como também com a decomposição dos componentes lipídicos (Fernandes et al., 2010; PerkinElmer, 2014).

Os triglicéridos desagregam-se por reações de hidrólise, lipólise ou oxidação dando origem ao glicerol e aos ácidos gordos livres. A acidez não se relaciona diretamente com o sabor do azeite, uma vez que os produtos de reação são insípidos e inodoros, não acarretando, portanto defeitos sensoriais (Peri, 2014).

O aumento considerável da acidez do azeite advém da sua alteração pela formação de ácidos gordos livres de cadeia longa, bem como de ácidos orgânicos de cadeia curta, aldeídos e cetonas resultantes do processo de oxidação. O aumento da acidez está relacionado a condições de laboração inapropriadas ou deficiente acondicionamento da matéria-prima, bem como do produto final (Rios et al., 2013).

A acidez é expressa sob a forma de percentagem de massa, % (m/m) de ácidos gordos livres em relação a um ácido gordo específico, nomeadamente o ácido oleico ($M = 282,46 \text{ g/mol}$).

Desta forma a acidez apresenta-se % (m/m) de ácido oleico (Codex Alimentarius, 2001; ISO 660:2009).

A sua determinação é feita através da volumetria ácido-base com solução KOH como titulante e solução de fenolftaleína como indicador, permitindo o acompanhamento da reação de rancificação (ISO 660:2009).

2.2.3 Índice de peróxidos

Os peróxidos formam-se na reação de oxidação e afetam a estabilidade do produto, causando a rancidez hidrolítica. A presença de peróxidos deve-se a temperaturas elevadas e a exposição a oxigénio por períodos prolongados (Gertz et al., 2014).

A sua determinação é útil para monitorizar a deterioração oxidativa inicial do azeite, sendo esta influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos gordos e pela quantidade de antioxidantes presentes (Mello & Pinheiro, 2012). Quanto maior for o número de ligações insaturadas nos ácidos gordos, maior é a suscetibilidade do azeite a reações de oxidação (Mello & Pinheiro, 2012 e Rios et al., 2013). O seu limite de consumo corresponde a 20 mEq O₂/kg (miliequivalentes de oxigénio por kilograma) de azeite (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Quando o índice de peróxidos encontra-se elevado é indicativo de degradação do azeite, devido possivelmente a questões relacionadas com a manipulação inadequada do azeite ou deficiente preservação do azeite (PerkinElmer, 2014).

Os antioxidantes presentes no azeite reagem com os radicais livres resultantes do processo oxidativo. Com isso, o índice de peróxidos aumenta apenas quando os antioxidantes existentes são insuficientes para compensar a formação desses radicais, dito de outra forma, num estado inicial existe um equilíbrio entre a taxa de formação de peróxidos e a sua taxa de degradação (Martínez-Pineda et al., 2011).

Para a determinação do índice de peróxidos recorre-se à volumetria de oxi-redução, através da titulação iodométrica que se baseia na determinação de substâncias capazes de oxidar o iodeto de potássio em meio ácido, originando o iodo. As substâncias provenientes do processo de oxidação dos ácidos gordos são consideradas como sendo peróxidos ou produtos semelhantes, nomeadamente hidroperóxidos (ISO 3960:2007; Mello & Pinheiro, 2012).

A iodometria aplicada resulta da reação do grupo hidroperóxido (ROOH) com o iodeto de potássio (KI). A quantidade de iodo (I₂) libertado é proporcional à quantidade de peróxidos presentes na amostra. Este iodo é determinado por titulação com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), utilizando amido como indicador. Assim, um elevado índice de peróxidos pode estar relacionado com o aumento da formação de hidroperóxidos (Pokorny et al., 2001).



2.2.4 K₂₃₂, k₂₆₈ e ΔK₂₆₈

A absorvância no ultravioleta é utilizada, em especial para detectar os compostos oxidados anormais num azeite virgem (Granados, 2000).

Os valores dos coeficientes específicos K₂₆₈, K₂₃₂ e ΔK₂₆₈ são utilizados para avaliar a autenticidade e a qualidade do azeite, sendo o K₂₆₈ o coeficiente de extinção específica a 268 nm, o K₂₃₂ o coeficiente de extinção específica a 232 nm e o ΔK a variação do valor absoluto da extinção específica e é determinado da seguinte forma (Boskou, 1998; Kiritsakis, 1992):

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \quad \text{equação (2.1)}$$

Em que K_m representa o coeficiente de extinção específica ao comprimento de onda m, sendo o comprimento de onda para absorção máxima por volta de 270 nm (Boskou, 1998).

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

2.2.5 Fração Saponificável

A fração saponificável representa entre 98 - 99% do total dos constituintes do azeite e é constituída pelos componentes de concentração mais elevada, como os acilgliceróis (mono, di e tri), os ácidos gordos e ácidos gordos livres, e os fosfolípidos (Boskou, 1998).

2.2.5.1 Ácidos gordos

Os lípidos apresentam propriedades físicas, químicas, mas também fisiológicas que os tornam importantes na incorporação na dieta. Estruturalmente este tipo de compostos é muito heterogéneo, tendo como denominador comum o facto de serem imiscíveis na água e solúveis em solventes orgânicos. Estas biomoléculas são conhecidas pelas suas propriedades homeostáticas nos seres vivos, principalmente a nível do isolamento térmico e depósito de reservas energéticas. Participam ainda na composição das estruturas membranares biológicas, actuam como cofactores enzimáticos, mensageiros intracelulares, transportadores de electrões, desempenhando simultaneamente funções hormonais (Nelson & Cox, 2005).

Os ácidos gordos são a unidade mais simples dos lípidos. São compostos por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) e numa das extremidades da cadeia alquílica apresentam um grupo carboxilo (-COOH), que lhe confere um carácter ácido e um grupo metilo (-CH₃) não funcional na extremidade oposta. Na sua maioria encontram-se na sua forma esterificada em glicerol (mono, di ou triglicerol) ou sob a forma dos seus derivados (glicolípido, fosfolípido e ésteres de colesterol), podendo encontrar-se ainda como ácidos gordos livres (FFA) (Nelson & Cox, 2005). A sua produção é realizada no fígado e posteriormente são transferidos para outros tecidos para serem utilizados como combustíveis metabólicos (Horton et al., 1996).

Nos óleos e gorduras naturais a cadeia de ácidos gordos é linear e, no caso dos ácidos gordos insaturados, apresenta-se na forma *cis* (Guardado et al., 2006).

Do total de ácidos gordos presentes no azeite, entre 53 a 87% correspondem a monoinsaturados, constituindo a principal característica do azeite, 4 a 20% a polinsaturados e 5 a 15% de saturados (Gutiérrez & Carretero, 2009).

Tabela 2.1 - Ácidos gordos existentes no azeite e respetiva proporção (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991)

Ácido gordo	Designação abreviada	Proporção (%)
Ácido láurico	(C 12:0)	Vestígios
Ácido mirístico	(C 14:0)	< 0,03
Ácido palmítico	(C 16:0)	7,5-20,0
Ácido palmitoléico	(C 16:1)	0,3-3,5
Ácido heptadecanóico	(C 17:0)	< 0,4
Ácido heptadecenóico	(C 17:1)	< 0,6
Ácido esteárico	(C 18:0)	0,5-5,0
Ácido oléico	(C 18:1)	55,0-83,0
Ácido linoléico	(C 18:2)	2,5-21
Ácido linolénico	(C 18:3)	< 1
Ácido araquídico	(C 20:0)	< 0,6
Ácido beénico	(C 22:0)	< 0,2
Ácido erúcico	(C 22:1)	Vestígios
Ácido lignocérico	(C 24:0)	< 0,2

A sua classificação está relacionada com o comprimento da cadeia carbonada, número, posição e configuração das ligações duplas. Assim, a cadeia de carbono pode ser classificada como pequena (4-6 carbonos), média (8-12 carbonos), longa (14-20 carbonos) e muito longa (≥ 22 carbonos) (Nelson & Cox, 2005).

Por sua vez quando não possuem ligações duplas na sua estrutura molecular são designados por ácidos gordos saturados (SFA), ao passo que os que possuem pelo menos uma ligação dupla são denominados de insaturados. Dentre estes, podem ser monoinsaturados (MUFA), quando possuem apenas uma ligação dupla ou polinsaturados (PUFA) quando possuem duas ou mais ligações duplas. Os ácidos gordos podem também ser classificados como não essenciais quando têm finalidades energéticas e essenciais quando o organismo não os consegue sintetizar e sua aquisição depende exclusivamente dos alimentos ingeridos. Os principais ácidos gordos essenciais pertencem às famílias ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6) e são os ácidos linoleico (LA 18:2 ω 6) e α -linolénico (ALA 18:3 ω 3) (Huss, 1995).

O ácido oleico é o principal ácido gordo do azeite. De acordo com as regras estabelecidas pelo Conselho Oleícola Internacional (COI), sua concentração deve variar entre 55 a 83% do total dos ácidos gordos. O ácido gordo polinsaturado mais abundante no azeite é o linoleico, sua concentração deve variar entre 2,5 e 21% (COI, 2015). Devido a este último, o azeite pode ficar rançoso facilmente, porque está sujeito à oxidação e por isso o tempo de armazenamento poderá ser menor (Gunstone, 2011).

Em uma dieta mediterrânica, o azeite é a principal fonte de gordura, portanto, o ácido oleico, entre os ácidos gordos monoinsaturados, e o ácido linoleico, entre os ácidos gordos polinsaturados, são os ácidos gordos mais abundantes (Šarolić et al., 2014).

O ácido α -linolénico, o ácido gordo ômega-3, segundo padrões do COI não deve estar presente em concentrações superiores a 1%, para além dos benefícios que pode trazer para a saúde, possui um grau de insaturação superior ao ácido linoleico e por isso torna o azeite suscetível à oxidação e consequente rancidez (Gunstone, 2011).

Os ácidos gordos saturados mais abundantes no azeite são o ácido palmítico (7,5-20%) e esteárico (0,5-5%). Os ácidos mirístico, heptadecenóico, araquídico, beênico e lignocérico estão presentes em quantidades pequenas ou vestigiais (COI, 2015).

A presença de ácidos gordos que devem estar ausentes ou presentes em quantidades diferentes das encontradas é um marcador de adulteração com outros óleos vegetais. A esse respeito, atenção especial é dada aos ácidos mirístico, araquídico, beênico, lignocérico, gadoleico e α -linolénico, cujos limites são estabelecidos pelo COI (Gunstone, 2011).

Contudo a composição de ácidos gordos pode diferir de amostra para amostra, dependendo do local de produção, da latitude, do clima, da variedade e do estágio de maturação da fruta no momento da extração do óleo. Os azeites gregos, italianos e espanhóis são pobres em ácidos linoleico e palmítico e possuem uma alta percentagem de ácido oleico. Os azeites tunisinos são mais ricos em ácidos linoleico e palmítico e mais pobres em ácido oleico (Boskou, 2006).

Como dito anteriormente, os ácidos gordos no azeite estão quase inteiramente presentes como triglicéridos. Em pequena percentagem eles também estão presentes como diglicéridos,

monoglicéridos e na forma livre. Durante a biossíntese de triglicéridos, graças à presença de enzimas específicas, apenas cerca de 2% do glicerol se liga ao ácido palmítico na posição sn-2, pois a maior parte se liga ao ácido oleico, contudo se a esterificação não for enzimática a percentagem de ácido palmítico na posição sn-2 aumenta significativamente (Gunstone, 2011).

Existe uma menor percentagem de ácidos gordos que se encontram na forma livre, provenientes de reações de hidrólise dos triacilglicéridos, sendo responsáveis pelo grau de acidez livre do azeite. Más condições de armazenamento da azeitona, por exemplo, podem resultar num aumento considerável da acidez livre do azeite, em detrimento da sua qualidade (Kiritsakis & Markakis, 1987).

Entre os triglicéridos presentes em proporções significativas no azeite, existem: trioleína (40-59%); palmitodioleína (12-20%); linoleodioleína (12,5-20%); palmitooleolinoleína (5,5-7%); estearodioleína (3-7%). A trilinoeína (LLL) é um triglicérido que contém três moléculas de ácido linoleico. Seu baixo teor é um indicador de um óleo de boa qualidade. Triglicéridos contendo três ácidos gordos saturados ou três moléculas de ácido α -linolénico não foram relatados. Estes símbolos de três letras representam todos os triacilglicéridos isoméricos contendo os três grupos acil indicados, em que P = palmítico, O = oleico, S = esteárico, L = linoleico e Ln = ácido linolénico (Boskou, 2006).

A presença de diglicéridos e monoglicéridos é devida a uma síntese incompleta ou a uma hidrólise parcial dos triglicéridos. O conteúdo de diglicéridos em azeite virgem varia de 1,0 a 2,8%. Os 1,2 diglicéridos prevalecem no azeite fresco, representando mais de 80% dos diglicéridos. Durante o armazenamento do óleo, a isomerização ocorre com um aumento progressivo dos isómeros 1-3 mais estáveis, que após cerca de 10 meses tornam-se os principais isómeros. Portanto, a relação 1,2/1,3-diglicéridos pode ser utilizada como indicador da idade do azeite. Os monoglicéridos estão presentes em quantidades inferiores aos diglicéridos, <0,25%, com 1-monoglicéridos muito mais abundantes do que os 2-monoglicéridos (Gunstone, 2011).

A presença de mono e diacilglicéridos no azeite está relacionada não apenas com a biossíntese incompleta de triacilglicéridos, mas principalmente, com a ocorrência de reações de hidrólise (Kiritsakis & Christie, 2000).

2.2.6 Fração insaponificável

A fração insaponificável, representa a restante parte do peso do azeite (1 a 2%) e engloba, entre outros, esqualenos, esteróis, álcoois gordos, ceras, compostos fenólicos (polifenóis e tocoferóis), compostos voláteis e pigmentos (clorofilas e carotenoides). Embora esta fração assente na parte minoritária da composição do azeite, a sua contribuição é extremamente importante do ponto de vista biológico (Gómez-González et al., 2011).

2.2.6.1 Estigmastadienos

Os estigmastadienos são hidrocarbonetos esterólicos que existem em pequenas quantidades no azeite (0,5 mg/kg) devido a processos de refinação a partir do β -sitosterol (Sánchez et al., 2001).

Os estigmastadienos também são formados em pequenas quantidades a partir do estigmasterol durante os processos de refino de azeites realizados termicamente ou com o uso de carbono ativo. Em azeite virgem este composto está praticamente ausente e, portanto, sua determinação permite detectar a presença de óleos refinados (azeite, bagaço de azeitona, girassol, palma, etc.) em azeites virgens, mesmo que sejam adicionados em pequenas quantidades (PerkinElmer, 2014).

2.2.6.2 Esteróis e uvaol e eritrodiool

Os esteróis são compostos pertencentes à classe dos esteróides, constituídos por um núcleo esteróide que é resultante da fusão de quatro anéis de hidrocarbonetos, denominado, ciclopentanoperidrofenantreno e uma cadeia lateral ligada ao núcleo esteróide no carbono 17, conforme é visualizável na figura 2.1 (Akoh & Min, 2002; Dewick, 2002).

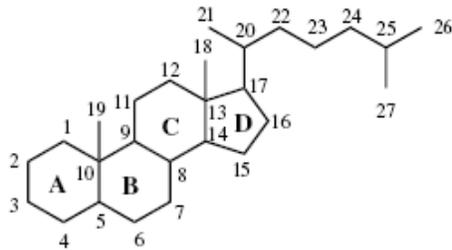


Figura 2.1 - Fórmula Geral dos esteróides

Os esteróis contêm um grupo hidroxila no carbono 3 e podem possuir uma cadeia formada por 27 a 29 átomos. Nas plantas são denominados fitoesteróis, na sua maioria possuem um ou dois carbonos extras na cadeia lateral, ligado ao carbono na posição 24. Os diversos esteróis diferem entre si pela presença de duplas ligações nos anéis A e B e por diferenças nas cadeias laterais ou em número de carbonos (Akoh & Min, 2002; Dewick, 2002).

A biossíntese de esteróis é realizada a partir do esqualeno no citoplasma das células da azeitona podendo apresentar-se na forma livre ou esterificados com ácidos gordos, que após uma reação de epoxidação origina o 2,3-epoxiesqualeno. Este cicliza formando quatro anéis, originando o cicloartenol, conforme ilustrado na figura 2.2 (Akoh & Min, 2002; Dewick, 2002).

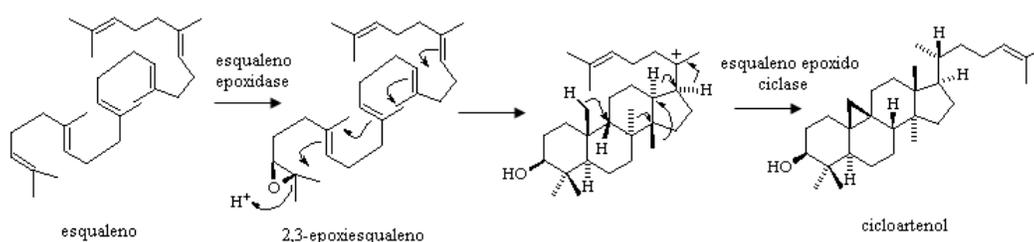


Figura 2.2 - Ciclização do esqualeno a cicloartenol

A formação dos esteróis a partir do cicloartenol dá-se por reações como a alquilação da cadeia lateral no carbono 24, a remoção dos grupos metilo dos carbonos 4 e 14 e a formação das duplas ligações (Akoh & Min, 2002).

O azeite possui uma diversidade enorme de esteróis nomeadamente o colesterol, o brassicasterol, o 24-metilenocolesterol, o campesterol, o campestanol, o estigmasterol, o Δ -5,23-estigmasdienol, o clerosterol, o β -sitosterol, o sitostanol, o Δ -5-avenasterol, o Δ -5,24-estigmastadienol, o Δ -7-estigmastenol e o Δ -7-avenasterol. A estrutura destes compostos está representada na figura 2.3 (Akoh & Min, 2002).

O esterol que se encontra em maior quantidade no azeite é o sitosterol, representando de 75 a 95% do total de esteróis. O estigmasterol, o campesterol e o Δ -5-avenasterol também são encontrados em níveis significativos, estando os restantes esteróis presentes em concentrações relativamente baixas (Kycyk et al., 2016).

Este é o caso do colesterol, que se encontra em concentrações tão baixas, que normalmente, não apenas no azeite como em todos os produtos de origem vegetal, são considerados sem colesterol (Kycyk et al., 2016).

O perfil de esteróis dos VOO tem uma enorme importância como parâmetro de qualidade e pureza, já que pode ser usado para deteção de fraudes de azeite adulterado com outras gorduras e óleos comestíveis. Os limites para o teor total de esteróis e alguns esteróis individuais foram estabelecidos para o azeite e óleo de bagaço de azeitona pelos regulamentos da União Europeia (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991) e Conselho Oleícola Internacional (COI, 2015). A sua diminuição durante o armazenamento tem sido associada ao aumento do valor do índice de peróxidos (Sanchez et al., 2001).

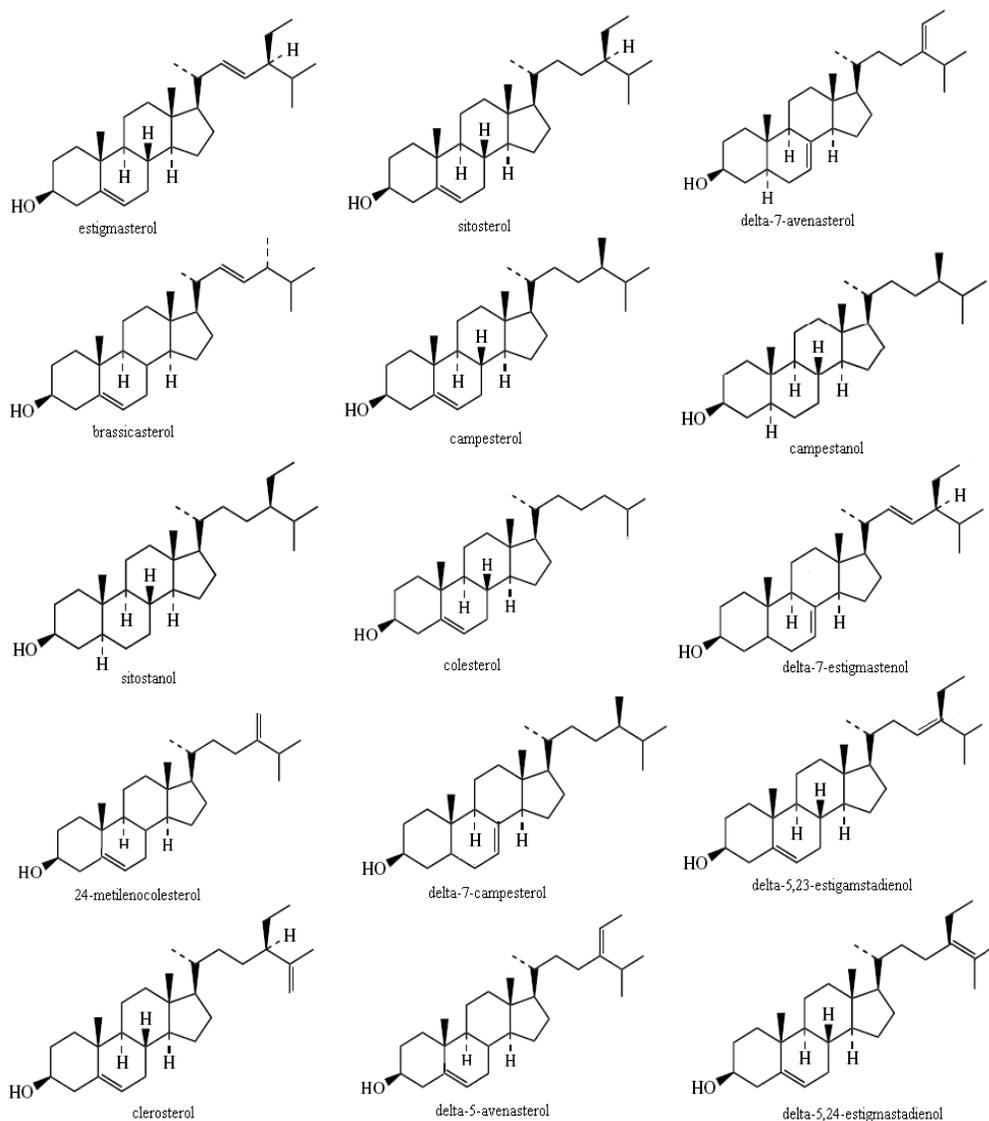


Figura 2.3 - Estrutura química dos esteróis presentes no azeite (Akoh & Min, 2002)

Na tabela 2.2 pode observar-se a percentagem de cada um dos diferentes esteróis presentes no azeite, sendo que a percentagem de sitosterol corresponde à soma das percentagens parciais do β -sitosterol, Δ -5-avenasterol, Δ -5,23-estigmasdienol, do clerosterol, do sitostanol e do Δ -5,24-estigmastadienol (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Tabela 2.2 - Proporção de esteróis presentes no azeite (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991)

Esterol	Proporção (%)
Colesterol	≤ 0,5
Brassicasterol	≤ 0,2 para óleos de bagaço ≤ 0,1 para os outros tipos
Campesterol	≤ 4,0
Estigmasterol	< campesterol
β-sitosterol	≥ 93,0
Δ-7-estigmastenol	≤ 0,5

O uvaol e eritrodiol pertencem ao grupo dos álcoois triterpénicos, o teor destes é utilizado como parâmetro de pureza do azeite, pois um valor muito elevado é indicativo de que o azeite foi obtido por solventes (Reiter & Lorbeer, 2001).

O eritrodiol e o uvaol são dióis triterpénicos constituídos por cinco anéis hexagonais, que provêm, sobretudo, do epicarpo das azeitonas. Estão presentes em pequenas quantidades nos azeites virgens mas em quantidades muito maiores nos óleos refinados, devido à sua relativa insolubilidade nos lípidos (Peres et al., 2009).

2.2.6.3 Ceras

As ceras são ésteres de álcoois gordos de cadeia longa que podem conter até 58 átomos de carbono. As principais ceras presentes no azeite, possuem números de carbono par, isto é são ésteres de ácido oleico ou palmítico, como C36, C38, C40, C42 e C46 (Boskou, 2006).

As ceras estão presentes na pele das azeitonas, evitando a perda de água e por isso são abundantes no óleo de bagaço de azeitona e em azeite lampante. A elevada acidez dos azeites faz aumentar a quantidade de ceras, uma vez que ocorre a esterificação dos álcoois alifáticos com ácidos gordos livres, sendo assim este parâmetro pode ser utilizado como critério para diferenciação dos vários tipos de azeite (Boskou, 2006).

A qualidade e estabilidade de um azeite à semelhança dos outros óleos vegetais é influenciada pela presença de ceras. Estas são lipossolúveis em temperaturas elevadas e tendem a cristalizar a temperaturas mais baixas, causando turbidez quando o azeite é arrefecido (Akoh & Min, 2002).

O teor de ceras no azeite é, normalmente, muito baixo, não podendo ultrapassar os 150 mg/kg de azeite virgem (COI, 2015).

Tabela 2.3 - Quantidade de ceras nos diferentes tipos de azeite

Tipo de azeite	Ceras (mg/kg)
Virgem extra	≤ 150
Virgem	≤ 150
Lampante	≤ 300
Refinado	≤ 350
Azeite	≤ 350
Óleo de bagaço de azeitona refinado	> 350
Óleo de bagaço de azeitona	> 350

2.2.6.4 Pigmentos

A cor do azeite virgem extra varia do verde ao amarelo devido à prevalência de substâncias corantes (Moyano et al., 2010). As clorofilas e os seus produtos de oxidação, as feofitinas, são responsáveis pela cor esverdeada e os carotenóides (luteína, β-caroteno e diversas xantofilas) atribuem a cor amarelada aos azeites. Estes pigmentos contribuem para a estabilidade do azeite protegendo-o da foto-oxidação (Giuffrida et al., 2007).

2.2.6.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis podem ser definidos como substâncias que possuem um anel benzénico ligado a um ou mais grupos hidroxílicos. A concentração média de compostos fenólicos no azeite não é uniformizada e pode variar, por exemplo, entre 200 e 1500 mg/kg (Allouche et al., 2007) ou entre 326 e 1110 mg/kg (Allouche et al., 2007).

Estes compostos apresentam atividade antioxidante, conferindo a resistência do azeite à oxidação, melhorando a sua estabilidade e ainda atribuem propriedades organolépticas (Allouche et al., 2007; Navarra et al., 2011). A inibição da oxidação é feita através de inúmeros mecanismos de eliminação de radicais, transferência de átomos de hidrogénio e ação quelante de metais. No entanto, estes fenóis são consumidos após reações com as espécies radicalares (Barros et al., 2013).

Existem várias classes de compostos fenólicos presentes no azeite, destacando-se os ácidos fenólicos (ácido benzóico e ácido cinâmico), álcoois fenólicos (hidroxitiroso e tirosol), flavonoides (luteolina e apigenina), lignanas (pinoresinol e acetoxipinoresinol) e secoiridóides (oleuropeína e ligstrosídeo) (Bešter et al., 2008; Krichene et al., 2010).

O ligstrosídeo juntamente com a oleuropeína formam a parte principal da fração fenólica, sendo este último um componente exclusivo das azeitonas e do azeite. Existem outros compostos

fenólicos simples presentes, tais como o ácido cafeico, ácido vanílico e ácido ferúlico que têm um efeito protetor sobre o α - tocoferol e lignanas (Bešter et al., 2008).

2.2.7 Soma dos isómeros transoleicos (%) e Soma dos isómeros translinoleicos + translinolénicos

A configuração normal de ligações duplas em ácidos gordos insaturados é a *cis.*, contudo durante as reações de isomerização que ocorrem durante os processos de refinação (branqueamento e desodorização) a configuração é modificada formando isómeros *trans.* Portanto, a presença de isómeros *trans* de ácidos gordos em valores acima do paramétrico é indicação de ocorrência de processo de refinação (PerkinElmer, 2014).

Para os azeites virgem e virgem extra, os isómeros transoleicos não devem ultrapassar 0,05% do total dos ácidos presentes e a soma dos isómeros translinoleicos + translinolénicos também não deve ultrapassar 0,05% (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991).

2.2.8 Ésteres etílicos e metílicos

A presença de ésteres metílicos (FAMEs) e ésteres etílicos (FAEEs) no azeite é indicativo de que ocorreu uma reação de ácidos gordos livres com metanol (formado na degradação das paredes celulares) ou etanol (formado durante os processos de fermentação). A sua presença indica uma manipulação incorreta de azeitonas ou uma leve desodorização do azeite (para eliminar os odores produzidos por microrganismos). A sua determinação pode ser realizada sem a saponificação do azeite e usando preparativos apropriados de cromatografia antes da análise por cromatografia gasosa (GC) (PerkinElmer, 2014).

Os ácidos gordos livres, os mono- di- e triglicéridos produzidos quando as azeitonas estão armazenadas antes da trituração são convertidos rapidamente em alquil ésteres por esterificação microbiana com etanol e metanol. A desodorização retira os cheiros desagradáveis e estes azeites desodorizados misturados com um azeite frutado poderiam, em teoria, passar à prova de um painel sensorial. Sendo azeites não refinados a maioria dos parâmetros físico químicos deveriam estar dentro dos limites estabelecidos. Contudo, como a desodorização não retira os alquil ésteres, a sua presença pode ser considerada um bom marcador para azeite de baixa qualidade que foi submetido a uma desodorização suave (Pérez-Camino et al., 2008).

Relativamente a este parâmetro, um azeite virgem extra deve estar em conformidade com pelo menos uma das duas seguintes restrições: $\Sigma (FAME + FAEE) \leq 75 \text{ mg/kg}$ ou $75 \text{ mg/kg} < \Sigma (FAME + FAEE) \leq 150 \text{ mg/kg}$ e $(FAEE/FAME) \leq 1,5$ (Regulamento (UE) N.º 299/2013 da Comissão de 26 de Março de 2013, 2013)

2.2.9 Triacilgliceróis com NCE42

Para classificar os triacilgliceróis (TAG) adotou-se o parâmetro NCE, número equivalente de carbonos, que corresponde ao número total de carbonos dos seus ácidos gordos menos duas vezes o número total de ligações duplas. O azeite possui TAGs com NCE de 44, 46, 48 e 50, mas praticamente nenhum TAG com NCE de 42, sendo que o NCE do TAG mais abundante no azeite, a trioleína é 48. Devido a esta constatação, que demonstra que o ECN42 é um bom indicador da pureza do azeite, incorporou-se a diferença, Δ , entre o ECN42 teórico (calculado a partir do perfil de ácidos gordos obtido por cromatografia gasosa) e o ECN42 experimental (derivado de cromatografia líquida de alta eficiência) no regulamento do azeite comercializável, com a designação Δ ECN42, e permite controlar a fraude de mistura de outros óleos que não sejam azeite (Aued-pimentel et al., 2008).

No caso dos azeites virgem e virgem extra, Δ ECN42 deve ser menor ou igual a 0,2. Para os azeites lampantes e refinados, Δ ECN42 deve ser menor ou igual a 0,3 (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

2.2.10 Monopalmitato de 2-glicerilo

A biossíntese de triglicéridos ocorre por meio de enzimas específicas, a partir de ácidos gordos livres e glicerol. No caso dos azeites virgens apenas cerca de 2% de ácido palmítico presente está ligado na posição 2. Por outro lado, no azeite artificialmente esterificado a ligação com o glicerol ocorre de forma aleatória, aumentando significativamente esta percentagem. Esta concentração é determinada após digestão enzimática de sítios específicos do triglicérido (que elimina os ácidos gordos da posição 1 e 3) e subsequente análise dos monoglicéridos por Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID) (PerkinElmer, 2014).

O valor paramétrico do monopalmitato de 2-glicerilo é $\leq 0,9\%$, se percentagem de ácido palmítico total $\leq 14\%$, e $\leq 1,0\%$, se a percentagem de ácido palmítico total for maior que 14% (PerkinElmer, 2014).

2.2.11 Trilinoleína

Tal como já referido anteriormente a trilinoleína é um triacilglicerol com três ácidos linoleicos esterificados à molécula de glicerol (Boskou, 2006).

Uma adulteração de azeite com baixo teor (<5%) de óleos de sementes (exceto óleo de amendoim) pode ser verificada pela deteção dos níveis crescentes de trilinoleína ou tripalmitina em azeite, nos quais essas espécies de TAG estão normalmente ausentes ou presentes em níveis muito baixos (<0,5%) (Andrikopoulos et al., 2001).

Os óleos de sementes como óleo de girassol, de milho, de soja possuem um teor elevado de trilinoleína, pelo que valores aumentados, levantam a suspeita de adulteração do azeite pela adição desses óleos. Pelo contrário, o óleo de palma e o de amendoim possuem baixos níveis de trilinoleína (Řezanka & Mareš, 1991).

2.2.12 Solventes Halogenados

Os solventes halogenados são compostos orgânicos voláteis em cuja estrutura possuem átomos de cloro (Cl), fluor (F), bromo (B) e iodo (I). Sendo que os mais utilizados são o clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, tricloroetano e bromofórmio (Gribble, 2004). Estes são utilizados para extrair o óleo de bagaço de azeitona do resíduo sólido obtido durante a prensagem do azeite, uma vez que este procedimento é mais barato, do que forçar a saída do óleo, contudo origina um óleo de qualidade inferior e que pode ser prejudicial à saúde (Manso et al., 2014).

Os solventes halogenados como o clorofórmio, o tetracloroetileno, o percloroetileno e o freon são contaminantes que podem ser encontrados em quantidades traço em azeites virgens (Boskou, 2006). Isto deve-se à utilização de água potável na prensagem da azeitona, pois pesquisas indicam que há formação de compostos halogenados (cloretos e brometos) que são extremamente solúveis em azeites, contribuindo para a sua concentração, assim como a utilização de água contaminada (Amelio, 2003).

A sua determinação é realizada na fração volátil (técnica do espaço cabeça) por cromatografia gasosa com detetor por captura de eletrões (GC-ECD) ou através da injeção direta no cromatógrafo gasoso, utilizando colunas adequadas. O limite para todas as categorias de azeite de cada composto halogenado é de 0,1 ppm, enquanto que a soma de todos não deve exceder os 0,2 ppm (Boskou, 2006).

2.3 Análise Sensorial

A classificação do azeite é regulada pelo Regulamento Oficial Europeu para o azeite e é realizada por painéis de teste certificados, nos quais a avaliação do sabor (picante e amargo) e o aroma desempenham um papel muito importante (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

A análise descritiva descreve com precisão e mede os atributos sensoriais dos alimentos. Dentre as várias metodologias existentes, podemos citar a análise descritiva quantitativa (QDA) que foi desenvolvida pela Tragon Corporation de Palo Alto, Califórnia (Stone et al., 1974). Segundo a metodologia os provadores examinam os alimentos e listam todas as propriedades sensoriais relevantes utilizando termos descritivos padrão. Para além disso é utilizada uma escala, onde o provador estima a intensidade de cada atributo sensorial considerado. Finalmente os dados obtidos são avaliados através de técnicas estatísticas comuns (De Santis & Frangipane, 2015).

O parâmetros estatísticos utilizados na análise sensorial são a mediana, o desvio padrão robusto (IQR), o coeficiente de variação percentual robusto (CVr%) e os intervalos de confiança a 95% da mediana (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

A mediana representa o valor central de uma série ordenada de números ímpares ou a média dos dois valores centrais de uma série ordenada de números pares. Os valores são expressos através da mediana do frutado e dos defeitos, sendo que por mediana dos defeitos entende-se a que tenha sido atribuída a intensidade mais alta. O IQR é calculado para indicar a variabilidade ao redor da mediana. O CVr% indica o percentual de variabilidade da série de números analisada e é aplicada para verificar a fidelidade dos resultados dos membros do painel. Por fim, os intervalos de confiança a 95% representam o intervalo no qual o valor da mediana poderia variar, na hipótese da experiência poder ser repetida um número infinito de vezes. Este parâmetro também avalia a fidelidade do ensaio (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Existem várias aplicações para a análise descritiva, nomeadamente para desenvolvimento de produtos, comparação de propriedades sensoriais dos produtos que não podem ser comparados simultaneamente (por exemplo azeite virgem de anos consecutivos). Esta análise também é empregue para estudos de vida útil, correlação de propriedades instrumentais e sensoriais, estudo dos efeitos da tecnologia de processamento sobre as características sensoriais de um produto, garantia de qualidade e para certificação de um padrão de qualidade predefinido (De Santis & Frangipane, 2015).

A comissão Europeia após a emissão de vários regulamentos (Regulamento da Comissão N.º 2568/1991 de 11 de Julho de 1991, o Regulamento da Comissão N.º 2472/1997 de 11 de Dezembro de 1997, o Regulamento da comissão N.º 796/2002 de 6 de Maio de 2002, o Regulamento da Comissão N.º 1989/2003 de 6 de Novembro de 2003, o Regulamento da Comissão N.º 1640/2008 de 4 de Julho de 2008 e o Regulamento da Comissão N.º 61/11 de 24 de Janeiro de 2011), estabelece e desenvolve os critérios necessários para avaliação química e das características sensoriais do azeite, bem como a sua metodologia (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Desde 1991, esta metodologia faz parte dos regulamentos da Comissão Europeia para classificação de azeites e é descrita em detalhes no Apêndice II do Regulamento da UE N.º 2568/91. O método, Análise Quantitativa Descritiva (QDA), define os principais atributos do azeite, tanto positivos como negativos. A aparência e a cor não foram selecionadas como parâmetros de qualidade do azeite virgem, uma vez que utiliza-se na prova um copo de vidro de cor escura (De Santis & Frangipane, 2015).

A qualidade sensorial de um alimento pode indicar o nível de aceitação, apreciação e nível de preferência do consumidor por um produto, e é determinada por um conjunto de características

que são avaliadas mediante os órgãos sensoriais quando expostos a estímulos físicos, químicos e físico-químicos (Gutierrez & Carretero, 2009).

A avaliação das características organolépticas é realizada por um painel de provadores treinado. As sensações percebidas podem ser designadas por atributos positivos quando são sensações agradáveis. Os atributos mais comuns num azeite são o frutado, o amargo e o picante e são conferidos pela variedade e pelo estado de maturação da azeitona. Porém, devido ao amadurecimento dos frutos, mudanças biológicas, oxidação, contaminação ou armazenamento defeituoso podemos ter sensações desagradáveis que são denominadas por defeitos ou atributos negativos, sendo o mais comum a tulha, o ranço e o mofo (Gutierrez & Carretero, 2009).

O nível de percepção dos odores diferem devido ao facto de que a salivação, o tamanho da boca, a respiração e a temperatura são fatores capazes de alterar a volatilidade dos odorantes do azeite e conseqüentemente o odor do VOO (Azeite Virgem) quando entra na boca (Van Ruth et al., 2001; Van Ruth & Roozen, 2000).

De facto, quando o azeite é colocado na boca, os odorantes são afetados por diferentes fatores. Inicialmente, a saliva tem um efeito de hidratação e pode produzir uma emulsão de água em óleo, a qual os compostos aromáticos são divididos entre a água e a fase oleosa. Posteriormente, eles são transportados da fase de dois líquidos para a fase de ar na boca e, em seguida, eles alcançam os recetores olfativos localizados no nariz. A transferência entre as duas fases líquidas diferentes, como a fase orgânica do azeite e a fase aquosa da saliva deve-se a uma propriedade molecular como a hidrofobicidade (polaridade) (Genovese et al., 2015).

Essa emulsão formada pode ser desestabilizada pelas proteínas salivares (mucinas, albumina e proteínas rica em prolina) e enzimas (amilase, lipase e lisozimas). Essas mudanças na estrutura da emulsão também têm um impacto sobre a percepção final (Arancibia et al., 2011).

Os azeites são classificados pela análise sensorial através da comparação da mediana do frutado e da mediana dos defeitos com os intervalos de referência a seguir indicados na tabela 2.4 (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Tabela 2.4 - Classificação dos azeites em função da mediana dos defeitos e da mediana do frutado

Categoria	Pontuação organolética
Azeite virgem Extra	Md = 0 e Mf > 0
Azeite Virgem	0 < Md ≤ 3,5 e Mf > 0
Azeite Lampante	Md >3,5 ou (Md < 3,5 e Mf = 0)

Md – Mediana do defeito (defeito com intensidade maior); Mf – Mediana do frutado; Mf e Md arredondados às décimas

Atributos positivos (de acordo com o Regulamento (CEE) N.º 2568/1991):

- **Frutado:** Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade da azeitona, por via direta e/ou retronasal, características dos azeites provenientes de frutos são e frescos, verdes ou maduros. O atributo frutado é considerado verde quando as sensações olfativas lembram a frutos verdes, característica associada a azeites procedentes de frutos verdes. O atributo frutado é considerado maduro quando as sensações olfativas lembram as de frutos maduros, característica dos azeites procedentes de frutos verdes e maduros.

- **Amargo:** Gosto elementar do azeite obtido a partir de azeitonas verdes ou azeitonas em fase precoce de maturação, sentido nas papilas calciformes que constituem o V lingual.

- **Picante:** Sensação tátil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, característica de azeites produzidos no início de campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.

Atributos negativos (de acordo com o Regulamento (CEE) N.º 2568/1991):

- **Tulha/Borras:** “Flavour” característico dos azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocaram num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contacto, nos depósitos e reservatórios, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.

- **Mofo/Húmido/Terra:** “Flavour” característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido ao armazenamento dos frutos durante vários dias em condições húmidas.

- **Ranço:** “Flavour” dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso.

2.3.1 Condições para a prova sensorial

Para cada sessão de análise sensorial são necessários de 8 a 12 provadores e o exame é realizado numa sala com uma temperatura entre 20 °C a 25 °C numa cabine individual. Cada cabine possui um copo normalizado com 15 ml de amostra, tapado com vidro de relógio e mantido a 28 °C \pm 2 °C, cuspidores, folha de perfil em papel ou informatizada e um copo de água, água gaseificada, rodelas de maçã ou biscoitos (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

O período da manhã, idealmente entre as 10 e as 12 horas, é o mais indicado para a realização da prova sensorial, pois trata-se do melhor período para a percepção de sabores e odores, assim como a sensibilidade gustativa e olfativa é maior antes das refeições (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Recomenda-se a já referida temperatura da amostra por se tornar mais fácil apreciar diferenças organolépticas do que à temperatura ambiente e porque, a temperaturas mais baixas, os compostos odoríferos peculiares dos azeites se volatilizam pouco, ao passo que a temperaturas mais elevadas se formam os compostos voláteis peculiares dos óleos aquecidos (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

A técnica consiste em pegar no copo tapado com o vidro de relógio e incliná-lo cuidadosamente, de seguida roda-se o copo cheio nesta posição, a fim de molhar o mais possível o seu interior. Seguidamente retira-se o vidro e cheira-se a amostra, inspirando lenta e profundamente. O exame olfativo não deve demorar mais do que 30 segundos (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Por fim avalia-se as sensações bucais (conjunto de sensações retronasais, olfativas, gustativas e táteis). Para isso deve-se sorver 3 ml de azeite, distribuindo o azeite por toda a cavidade bucal, desde a parte anterior da boca e da língua, passando pelos lados da boca, até à parte posterior, incluindo o palato e a garganta. É importante que uma quantidade suficiente de azeite se espalhe muito lentamente sobre a parte posterior da língua até ao palato e à garganta, ao mesmo tempo que o provador se concentra na avaliação da ordem pela qual surgem os estímulos amargo e picante. Se não proceder deste modo, ambos os estímulos podem passar despercebidos em alguns azeites ou então o estímulo picante pode fazer com que o amargor passe despercebido (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991, 1991).

Durante o processamento oral as sensações retronasais são provocados por odorantes do azeite que podem reagir com recetores de odor, movendo-se da boca para a cavidade nasal pela nasofaringe (Bojanowski & Hummel, 2012).

CAPÍTULO 3 – ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

3.1 Introdução

A palavra estatística deriva do latim “Estate”, ou Estado e a sua primeira utilização remonta ao século XVIII para obtenção de dados demográficos para o governo, para o recrutamento militar e para a cobrança de impostos (Esteves, 2009).

É uma parte da matemática aplicada que fornece métodos para a recolha, organização, descrição, análise e interpretação de dados e para a utilização dos mesmos na tomada de decisões. A estatística é dividida em três áreas, sendo elas a descritiva, a probabilidade e a inferência estatística (Neto, 2004).

A estatística descritiva destina-se a resumir os dados por meio da análise exploratória para retirar conclusões a respeito das características de interesse, a probabilidade é a ferramenta que permite deduzir a partir de um modelo as propriedades de um fenómeno aleatório e a inferência estatística consiste num conjunto de métodos que permite inferir o comportamento de uma população através do conhecimento da amostra. Sendo que por população entende-se como o conjunto de todos os elementos em estudo, que possuem pelo menos uma característica em comum e a amostra é um subconjunto da população (Neto, 2004).

A estatística descritiva envolve diferentes tipos de análise, dependendo do número de variáveis em estudo simultaneamente. Assim sendo, a análise univariada é aplicada quando existe uma única variável em estudo, quando são duas, aplica-se a bivariada, que permite a relação entre variáveis e por sua vez temos a análise multivariada que analisa três ou mais variáveis simultaneamente (Rencher, 2005).

Neste estudo e atendendo ao elevado número de variáveis será utilizada a estatística multivariada, nomeadamente a estatística não paramétrica e a análise hierárquica de *clusters* (HCA) que serão detalhadas no presente capítulo.

3.2 Objetivos da aplicação da estatística multivariada

As técnicas de estatística multivariada são utilizadas para retirar o máximo de informação de um conjunto complexo de dados. Estas técnicas são úteis para o controlo da qualidade, otimização e controlo de processos, pesquisa e desenvolvimento.

A técnica a ser aplicada depende da finalidade e da resposta pretendida após a análise dos dados. Esta resposta poderá depender do grau de relação entre as variáveis, da diferença entre grupos de amostras diferentes, da previsão de aderência de dados em grupos, da estrutura dos dados e do tempo de decurso de determinados eventos (Rencher, 2005).

Tendo em conta que o objetivo do presente estudo é correlacionar os parâmetros físico químicos com a análise sensorial do azeite as técnicas de análise multivariada constituirão uma ferramenta indispensável.

3.3 Variáveis

É importante alicerçar o tema das variáveis. Consoante a natureza dos dados as variáveis classificam-se em qualitativas (métricas ou categóricas) ou quantitativas (métricas). Por sua vez as qualitativas, expressas por categorias podem ser definidas em ordinais ou nominais e as quantitativas podem ser discretas, se utilizam apenas valores inteiros ou contínuas quando dispomos de toda a escala real.

Existem diferentes escalas para as variáveis, podendo ser nominais, quando não existe ordenação dentro da categoria, ordinais, quando há ordenação dentro da categoria, intervalares, quando usa um zero arbitrário ou de razão, quando usa um zero absoluto.

No presente estudo, as variáveis medidas são quantitativas contínuas, uma vez que provêm de análises físico químicas, tendo se utilizado uma escala de razão, atendendo aos atributos do azeite que estão a ser analisados (Hair et al., 2006).

As variáveis também podem ser classificadas em dependentes ou independentes, consoante a sua manipulação (Lino, 2009).

Após o entendimento da escala de medida, e antes de aplicar qualquer técnica de análise multivariada aos dados, é necessária uma análise exploratória dos mesmos.

3.4 Conceitos básicos

Este capítulo fará uma abordagem sucinta de conteúdos básicos da estatística.

Um dos métodos da inferência estatística, são os testes de hipótese, que permitem a partir de uma ou várias amostras averiguar se a hipótese sobre a ou as populações deve ou não ser rejeitada. A hipótese nula (H_0) que contém sempre a igualdade, isto é, a hipótese que se deseja testar é assumida como verdadeira, até prova estatística contrária. Para rejeição ou não da hipótese nula aplica-se uma estatística de teste apropriada ao caso em estudo. O oposto da hipótese nula é a hipótese alternativa (H_1) que pode ser bilateral ou unilateral, dependendo da circunstância. Para decidir a rejeição ou não da H_0 define-se o nível de significância α e compara-se com o valor da estatística de teste calculado. Contudo, neste teste de hipótese podem ser cometidos dois tipos de erro: o Erro Tipo I – rejeitar a H_0 sendo ela verdadeira; e, o Erro Tipo II – não rejeitar a H_0 quando esta é falsa. A probabilidade do Erro Tipo II é representada por β e a do tipo I é representada por α , isto é, o nível de significância que é definido pelo avaliador (Pereira & Requeijo, 2012)

Outro conceito de extrema importância para a estatística é o valor-p, um valor que é dado pelos softwares de estatística, quando é executado um teste estatístico nos mesmos. É a ferramenta mais utilizada para medir evidências contra a H_0 (Sellke et al., 2001). Este valor representa a probabilidade de encontrar um valor da estatística de teste maior ou igual ao observado, sabendo que H_0 é verdadeira (Bayarri & Berger, 2000).

Dito de outra forma, o valor-p, também denominado de nível descritivo do teste representa o menor nível de significância na qual a H_0 pode ser rejeitada.

3.5 Coeficientes de correlação - Estatística não paramétrica

Para se medir a linearidade entre duas variáveis utiliza-se a correlação paramétrica de Pearson, cujo coeficiente (r) destina-se a avaliar o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas, através de um índice adimensional que se situa entre -1 (correlação negativa perfeita) e 1 (correlação positiva perfeita), sendo 0 o valor que mostra que não existe dependência linear entre variáveis (Paranhos et al., 2014). Para distribuições normais a correlação de Pearson é a mais eficiente, contudo, para amostras que não sigam uma distribuição normal, ou apresente falta de homocedasticidade, existem outras correlações que fazem parte da estatística não paramétrica - Correlação de Spearman e correlação de Kendall. Esta técnica à semelhança da estatística paramétrica utiliza *ranks* (números de ordem), isto é, para testar se as k amostras são idênticas, ordenam-se as observações de todas as amostras e atribui-se o número de ordem (Croux & Dehon, 2010).

Ambas as correlações não possuem diferenças significativas, mas como os dados do presente estudo não apresentavam uma distribuição normal, assim como falta de homogeneidade de variância, e tendo em conta que a correlação de Spearman é a mais utilizada, mais simples e mais fácil de interpretar, considerou-se apenas a aplicação desta correlação (Hauke & Kossowski, 2011).

Muito embora estes dois tipos de correlações sejam muito semelhantes, usando *ranks* ao invés de valores observados, há algo que as distingue, que é o facto da correlação não paramétrica medir consistência e a paramétrica medir a forma, a linearidade. A correlação não paramétrica mede a consistência porque quando duas variáveis estão consistentemente relacionadas, os seus ranks estão relacionados. Assim sendo, os valores são ordenados por variável e são-lhe atribuídos um número de ordem (*rank*). Após essa atribuição é calculada a diferença d entre os ranks e calculado o coeficiente de correlação pela expressão apresentada de seguida:

$$r = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2-1)} \quad \text{equação (3.1)}$$

Neste caso, a H_0 formulada é que não existe correlação entre o conjunto de dados, sendo a H_1 o inverso. O coeficiente r_s também conhecido como ρ (que é representado pela letra grega rho) e varia igualmente entre -1, que significa monotonicamente decrescente, dito de outra forma, significa que enquanto um conjunto de dados aumenta o outro diminui e 1 que representa monotonia crescente (Gravetter & Wallnau, 2013).

Para concluir a correlação de Spearman não dá indicação de como as variáveis se relacionam, mas sim a consistência, isto é, se ambos crescem ou se têm comportamentos opostos, não importando se é linear, quadrático ou outro.

3.6 Hierarchical Clusters Analysis – HCA

A análise de *clusters* é uma técnica de reconhecimento de padrões não supervisionada, que tenta detetar padrões sem quaisquer informações, só apenas com os dados (Berrueta et al., 2007).

A utilização desta técnica tem o objetivo de agrupar os dados, com algum tipo de semelhança de forma natural em grupos (*clusters*) que tenham significado do ponto de vista desta semelhança. Desta forma, se os dados pertencem a um determinado *cluster* significa que estão relacionados. Estas relações necessitam de ser compreendidas, como uma forma de extrair informações sobre os dados que até aqui não tinham sido entendidas.

Na análise de *clusters* muitas vezes não existe especificação prévia sobre o número ou a natureza dos *clusters* aos quais os objetos serão atribuídos. Quanto melhor a similaridade entre os dados e maior a diferença entre os grupos, mais correto será o agrupamento (Berrueta et al., 2007; Ferreira & Hitchcock, 2009).

Existem dois métodos de *clustering* que se destacam entre os outros, a citar, são os métodos particionais (*partiotining methods*) e os métodos hierárquicos (*hierarchical methods*). Os particionais agrupam os dados num número de grupos previamente especificado, através de iterações que vão sendo feitas. Por sua vez os hierárquicos criam uma estrutura hierárquica que vai sendo construída através de duas formas: por aglomeração, em que se constrói o dendograma (nome do gráfico que apresenta a estrutura hierárquica) de baixo para cima com a fusão de elementos/grupos; ou por divisões (divisivos), que começam de cima para baixo, em que se tem um *cluster* que vai sendo dividido e subdividido (Mooi & Sarstedt, 2011).

No estudo em causa, devido ao desconhecimento do número de *clusters* (é exatamente o que se pretende descobrir e as suas características) irão ser aplicados métodos hierárquicos por aglomeração (HCA – *Hierarchical Clusters Analysis*). Dentre estes métodos é necessário ainda escolher a medida de semelhança/similaridade e o algoritmo de formação dos *clusters* (Mooi & Sarstedt, 2011).

As medidas de similaridade utilizadas foram as medidas de distância, que medem a semelhança como a proximidade entre as observações, possibilitando várias distâncias para a

medição (Hair et al., 2006). Existem duas opções de medidas, sendo elas, a distância euclidiana, que é a ligação entre dois objetos através de uma linha ou o quadrado da distância euclidiana que oferece progressivamente mais peso aos objetos que estão mais distantes (Mooi & Sarstedt, 2011). Uma vez que as diferenças são mais facilmente visualizáveis no dendrograma optou-se por utilizar o quadrado da distância euclidiana, cuja expressão para o seu cálculo é apresentada na seguinte equação.

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^n (x_{ik} - x_{jk})^2 \quad (\text{equação 3.2})$$

Esta medida calcula a distância para todos os pares de objetos e apresenta todas estas distâncias em forma de matriz, conhecida como matriz de proximidade ou matriz de distâncias. Consiste numa matriz quadrada simétrica com diagonal preenchida de zeros com todos os objetos e as respectivas distâncias entre eles, onde a distância entre A e B é igual à distância entre B e A e entre os mesmos objetos é zero (Hair et al., 2006; Mooi & Sarstedt, 2011).

Após a escolha da medida de semelhança, segue-se a escolha do algoritmo de aglomeração (*clustering*). Existem 5 algoritmos mais populares, a citar, a ligação simples (*single linkage*) ou critério do vizinho mais próximo, ligação completa (*complete linkage*) ou critério do vizinho mais afastado, ligação média (*average linkage*), método do centróide e o método de Ward.

No presente estudo optou-se por utilizar o método de Ward, por se tratar de um grande número de amostras, uma vez que este método foi desenvolvido para ser utilizado em amostras superiores a 100, contudo é muitas vezes utilizado em amostras pequenas, porque o resultado é igualmente consistente (Ward, 1963).

Este método foi desenvolvido por Ward, e foi publicado em 1963 no documento *Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function* pelo American Statistical Association – ASA no *Journal of the American Statistical Association*. O método para aumentar a homogeneidade dentro dos grupos, aglomera em cada etapa (*clustering*) os grupos que minimizam o aumento na soma total dos quadrados.

O método de Ward consiste essencialmente na soma dos quadrados entre dois *clusters*, para todo o conjunto de variáveis (Hair et al., 2006).

O resultado da análise de *clusters* é apresentado sob a forma de árvores hierárquicas, designadas por dendrogramas, ou gráficos de árvore, que consiste em gráficos com ramificações, que mostram o nível de distância onde houve uma combinação de objetos e por conseguinte formação de *clusters* (Hair et al., 2006; Mooi & Sarstedt, 2011). Pode ser visto um exemplo na Figura 3.1.

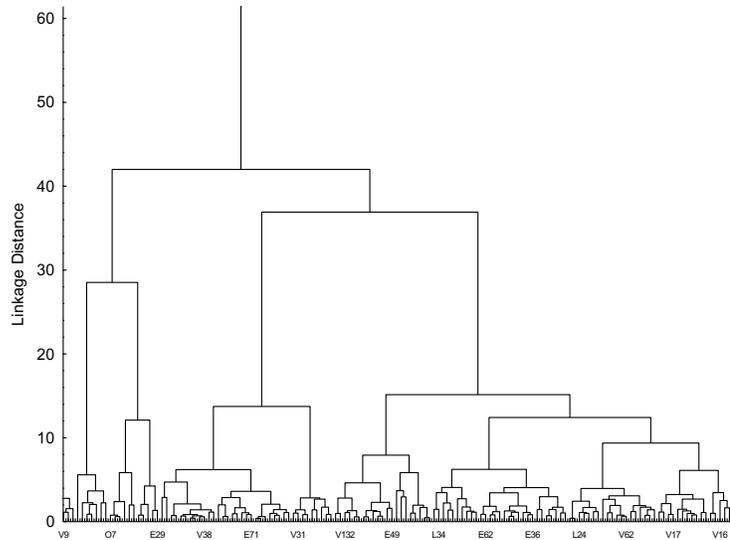


Figura 3.1 - Exemplo de um dendrograma

No que toca à análise e interpretação de *clusters*, esta é subjetiva, sendo o maior desafio a determinação do número de *clusters* ótimo. Pelo dendrograma, os *clusters* são dados pelo corte de ramo, e a grande questão é por onde cortar esses ramos. Existem modelos matemáticos que tentam solucionar, fazendo o corte por um valor de altura constante, mas em dendrogramas mais complexos essa solução não é eficaz. Logo a maneira mais eficaz é cortar os ramos onde estes apresentarem uma altura maior, sendo considerada uma thumb rule (regra de ouro), podendo ser executada a olho pelo investigador ou por modelos matemáticos mais avançados (Langfelder et al., 2008).

Existem essencialmente três métodos que permitem fazer a análise de *clusters*, nomeadamente *joining*, *two way-joining* e *k-means clustering* (StatSoft, Inc. Tulsa, 2013). Destes, o *joining* é a técnica mais utilizada, também conhecida como *Hierarchical Cluster Analysis* – HCA, sendo a principal finalidade a associação de objetos, tornando os *clusters* maiores através de uma qualquer medida de similaridade e posterior seleção de algoritmo de aglomeração (Mooi & Sarstedt, 2011). Este método origina desta forma dois diferentes tipos de dendrogramas, o *Horizontal Hierarchical Tree Plot* e o *Vertical Hierarchical Tree Plot*, que conforme os nomes indicam são gráficos horizontais ou verticais de uma árvore hierárquica, em que no início do gráfico os casos encontram-se isolados e totalmente desagrupados. Com o decorrer do método, as variáveis vão se agrupando e cada nó representa um novo *cluster*. No final é gerado um único *cluster* que envolve todas as variáveis (Statsoft, Inc. Tulsa, 2013).

A avaliação dos algoritmos pode ser feita internamente (sem recurso a conhecimento externo) ou externamente (comparando os resultados com agrupamentos já conhecidos) (Saraçli, et al., 2013), contudo, a escolha do método consiste na análise do dendrograma com base na facilidade de entender os resultados.

3.7 Aplicação da estatística multivariada no ramo alimentar

São inúmeros os estudos desenvolvidos na área alimentar que utilizam a estatística multivariada. A utilização deste tipo de técnicas tem como objetivos a classificação por diversos critérios das amostras alimentares, caracterização de macro e micronutrientes, averiguação de adulterações no processamento, produção ou etiquetagem (Berrueta et al., 2007).

Em Espanha um estudo realizado por Guimet e colaboradores (2004) aplicou uma análise de *clusters* a azeites para caracterização da categoria em virgem extra, virgem ou óleo de bagaço de azeitona.

Na Albânia, um estudo utilizou a análise de *clusters* para segmentar os consumidores albaneses quanto à sua percepção da qualidade do azeite e seus hábitos de compra (Imami et al., 2013). À semelhança deste estudo, um outro realizado na Universidade de La Republica no Uruguai recorreu à utilização de *Principal Component Analysis* (PCA) para segmentar os consumidores quanto à sua percepção da qualidade pela cor do azeite (Gámbaro et al., 2014).

Um estudo Italiano, que testou a deteção de aromas do azeite por sensores de um nariz eletrônico a diferentes condições, para tal utilizou análise de *clusters* e análise de componentes principais, inclusivamente permitiu comprovar a capacidade do nariz eletrônico de identificar a proveniência do azeite (Taurino et al., 2002).

Em Espanha para estudar os atributos de azeitonas de mesa de três variedades, recorreu-se à *Hierarchical Clusters Analysis* (HCA) e análise de componentes principais. Ainda que com uma técnica estatística diferente, este estudo também correlacionou a composição volátil com os atributos sensoriais utilizando modelos de regressão de mínimos quadrados (López-López, et al., 2018).

Para concluir, e apesar dos diferentes estudos apresentados anteriormente, aquele que mais se identifica com o presente caso de estudo foi desenvolvido em Itália, cujo objetivo era de correlacionar o teor de ácidos alquílicos com defeitos sensoriais do azeite através de análise de regressão linear e múltipla (Di Serio et al., 2017).

CAPÍTULO 4 – METODOLOGIA

Neste capítulo é apresentada e discutida a metodologia utilizada ao longo da presente investigação. As quatro principais etapas que permitiram cumprir os objetivos inicialmente delineados são apresentadas na Figura 4.1.

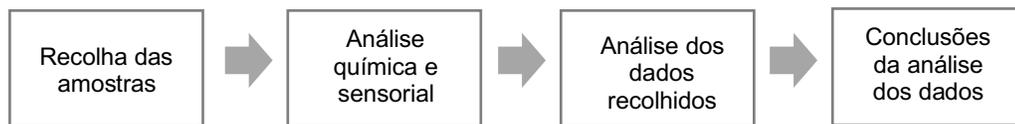


Figura 4.1 - Etapas da investigação subjacente à dissertação

As duas primeiras etapas foram realizadas por um laboratório – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica e as duas últimas pela autora da dissertação, sendo todas elas explicadas nos subcapítulos posteriores. Embora os dados analíticos não foram obtidos pela autora, houve participação na execução dos métodos para as determinações físico químicas do azeite, os quais são descritos no anexo I.

4.1 Análises físico químicas

Esta investigação consiste em analisar estatisticamente dados extraídos do azeite, mais especificamente parâmetros da qualidade nomeadamente, acidez, índice de peróxidos e análise por espectrofotometria no ultravioleta e parâmetros de pureza e autenticidade, que por sua vez trata-se do teor de esteróis, álcoois triterpénicos, estigmastadienos, triacilgliceróis com NCE42, ceras, ésteres metílicos e etílicos de ácidos gordos, e o perfil de ácidos gordos bem como os descritores sensoriais, provenientes do laboratório.

Partiu-se de uma base de dados composta por 1864 amostras, em que o critério de exclusão foi o não emparelhamento de análises (físico química e sensorial). Através da interpretação dos resultados de ambas as análises reclassificou-se os azeites, quanto à sua categoria, para verificar conformidade com a declarada no rótulo ou para identificação de fraude por adição de óleo vegetal. No total foram analisadas 349 amostras de azeite provenientes do comércio e do produtor. Desta forma, os azeites foram classificados em virgem extra, virgem, lampante, azeite, e azeite com adição de óleo vegetal.

Por se tratar de um laboratório de referência a nível nacional, os dados provenientes do mesmo têm que ser fidedignos, pelo que o laboratório tem um controlo interno para que não sejam extraídos resultados deturpados. No caso específico do azeite, as amostras recolhidas são provenientes de cada garrafa de azeite que dá entrada no laboratório. Assim que a garrafa é aberta, a primeira análise realizada é do índice de peróxidos, para garantir o mínimo contacto com

o oxigénio, seguidamente a amostra é filtrada, para eliminar partículas sólidas em suspensão que possam interferir com a leitura espectrofotométrica e é mantida em frascos até o momento da sua análise.

4.1.1 Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE)

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica é a autoridade administrativa de Portugal especializada nas áreas de segurança alimentar e fiscalização económica. Para além disso é um órgão de polícia criminal, dependente do Ministério da Economia, responsável pela avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, bem como pela disciplina do exercício das actividades económicas nos sectores alimentar e não alimentar (República Portuguesa, 2018). Em termos técnico-científicos o LSA (Laboratório de Segurança Alimentar) é dividido em três laboratórios, onde se destacam o Laboratório de Físico Química (LFQ) e a unidade laboratorial da câmara de produtores de onde são provenientes os dados para o presente estudo (ASAE, sem data).

O LSA desenvolve atividades na área da segurança alimentar de matérias primas, sendo o LFQ e a unidade laboratorial da câmara de produtores reconhecidos pelo Conselho Oleícola Internacional (COI), entidade intergovernamental no sector do azeite, como laboratórios com competência técnica para as análises físico químicas e sensoriais do azeite, através da participação em ensaios interlaboratoriais internacionais em que participam dezenas de outros laboratórios e em que se avalia o seu desempenho com periodicidade anual (ASAE, sem data).

4.1.2 Classificação das amostras

Foram reclassificadas 349 amostras considerando o resultado das análises físico químicas e sensoriais tendo em conta os limites propostos pela legislação Europeia.

Tendo em conta que o objetivo da ASAE, enquanto organismo fiscalizador, não é definir a categoria do azeite, mas sim verificar a conformidade do produto declarado no rótulo pelo operador económico com o Regulamento (CEE) N.º 2568/1991, desta forma existem azeites cujos parâmetros analisados no laboratório não tornam possível a sua classificação.

No âmbito deste trabalho e de modo a facilitar as conclusões possíveis, classificaram-se como sendo lampantes as amostras de azeite, que sendo inequivocamente provenientes do sumo da azeitona e não tendo qualquer refinação, não apresentavam condições de comercialização com as designações de azeite virgem ou virgem extra, tendo em conta os defeitos tanto físico químicos como sensoriais. O Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 e suas alterações apresentam outro tipo de caracterização para a designação de lampante.

Os azeites que receberam a categoria de lampante foram aqueles que possuíam parâmetros físico químicos fora dos limites de um azeite virgem.

A designação de azeites neste trabalho também não cumpre com o disposto no já referido Regulamento, ao invés disso inclui as amostras que possuem refinação e que são provenientes único e exclusivamente do sumo da azeitona.

Para entrar na categoria de azeite os parâmetros físico químicos indicativos de refinação tinham de estar fora dos limites para um azeite lampante, são eles os estigmastadienos e as absorvâncias das extinções específicas.

Por sua vez classificaram-se como azeite com adição de óleo, as amostras com refinação que possuem adição de uma gordura de outra origem, que não a proveniente do sumo da azeitona unicamente.

Para entrar na categoria de azeite com adição de óleo bastava que os critérios de pureza estivessem fora dos limites definidos para o azeite, a citar o perfil lipídico, o esterólico, NCE42, monopalmitato de 2-glicerilo e a trilinoleína. Para suspeita de adição de óleo de bagaço de azeitona bastava que as ceras e os álcoois triterpénicos (eritrodiool+uvaol) estivessem fora dos limites para o azeite, contudo no presente trabalho o número de amostras com esta suspeita foi muito pequeno, pelo que foi desconsiderado.

Quanto às categorias de azeite virgem e virgem extra seguiu-se o disposto no Regulamento (CEE) N.º 2568/1991. Deste modo foram classificados como virgem extra os azeites que possuíam todos os parâmetros físico químicos dentro do intervalo legislativo para essa categoria e que tinham mediana de frutado maior do que zero e que não tinham defeito.

4.3 Análise de dados

Antes de entrar na metodologia de análise dos dados propriamente dita, há que expor os softwares usados para tal. O Microsoft Office Excel 2016 (ou semelhante) é a ferramenta informática obrigatória em qualquer estudo estatístico, para pré-tratamento dos dados. Para além deste software básico, outra ferramenta estatística mais importante foi escolhida, nomeadamente o software Statistica® 7.0.

O primeiro passo do estudo consiste em caracterizar os azeites, verificando os valores analíticos obtidos para cada uma das 44 variáveis físico químicas, da mediana do frutado e dos defeitos com os intervalos impostos pela legislação Europeia em vigor, para as categorias do azeite virgem e virgem extra. As restantes categorias foram adotadas nesta dissertação mediante a presença de refinação nas amostras e à sua proveniência exclusiva ou não do sumo da azeitona. Para tal utilizou-se a função da formatação condicionada do Microsoft Office Excel 2016.

O passo seguinte é a pesquisa de correlações que possam existir entre os diversos parâmetros físico químicos e a análise sensorial. Para isso, utilizou-se a correlação de Spearman, por ser um tipo de estatística não paramétrica (para poder incluir todos os dados presentes no estudo). O Statistica só assinala as correlações cuja hipótese nula se rejeita e não dá a conhecer

o nível real de significância, por isso utilizou-se como recurso o Microsoft Office Excel 2016 para o cálculo do p-value.

Por fim, segue-se então a análise de *clusters*. Esta análise foi repartida em dois: pelas análises químicas discordantes das sensoriais e só com as concordantes e em cada um deles utilizou-se como algoritmo de *clustering*: o método de Ward.

4.2 Controlo interno

As análises realizadas no laboratório de físico química são controladas, isto é, em cada sessão de 10 amostras é realizado um duplicado e é calculado a sua média. Se a diferença entre os duplicados não tiver dentro da repetibilidade específica para o método analítico empregado é repetida nova análise.

Para além do controlo na medição existem outros quatro parâmetros fundamentais, sendo eles, a adição de padrão interno, os ensaios interlaboratoriais, a execução de ensaios em branco e o uso de materiais de referência certificados. Na ASAE, a adição de padrão interno no início da preparação da amostra tem o intuito de corrigir perdas que possam ocorrer durante a preparação da amostra e sua injeção. A razão entre as áreas do pico do analito e do padrão interno de concentração inicial conhecida servem para a quantificação do parâmetro em análise. Para que o objetivo seja cumprido o padrão interno deve obviamente ser altamente puro, não pode reagir com nenhum componente da amostra e deve ser quimicamente similar ao analito de interesse.

Por sua vez, os ensaios interlaboratoriais servem para garantir a veracidade dos resultados analíticos, garantindo a competência dos técnicos e o correto funcionamento dos equipamentos analíticos. Estes são feitos através da análise de amostras cegas enviadas por outros laboratórios de referência, sendo os seus valores reais desconhecidos. O LSA (laboratório de segurança alimentar) da ASAE no domínio da análise físico química possui competência reconhecida no setor, pois participa de circuitos de avaliação de competência laboratorial.

Em relação aos materiais de referência certificados, estes servem para o controlo de qualidade externo e são adquiridos por catálogo para controlar a exatidão dos resultados. Também são utilizados materiais de referência para controlo de qualidade interno obtidos em análise de avaliação de competência laboratorial e análises circulares, sendo o valor real desta vez conhecido.

Sempre que o método utilizado justifique é realizado um ensaio em branco em paralelo com a análise da amostra para atestar a qualidade analítica dos reagentes utilizados, por forma a garantir que não interferem nos resultados.

O controlo de qualidade interno às análises realizadas na unidade laboratorial da câmara de provadores é feito com base na análise de duplicados e no valor de coeficiente de variação

robusto (CvR%). Assim sendo, em todas as sessões de prova existe uma amostra provada em duplicado anonimamente.

Os resultados de cada sessão para serem aceites devem cumprir com a amplitude máxima $\leq 0,7$ para a mediana do frutado em relação ao duplicado e com a amplitude máxima $\leq 0,9$ para a mediana dos defeitos em relação ao duplicado, assim como o CvR% deve ser ≤ 20 . Também é feito um controlo individual dos provadores com base na determinação da coerência das suas avaliações nos duplicados relativamente a si próprio e ao painel.

Para além disso é feito um controlo externo por meio dos ensaios interlaboratoriais e da utilização de materiais de referência fornecidos pelo COI para aferição do painel.

4.4 Análise Sensorial

Os azeites foram submetidos a avaliação organoléptica conforme os métodos e normas aprovadas pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) para análise sensorial de azeites, nomeadamente, COI/T.20/DOC. nº15/Rev. 6 e COI/T.20/ DOC. nº 17. Foi realizada uma análise sensorial descritiva quantitativa por um painel treinado composto por 10 provadores aptos a classificar as amostras de azeites em uma escala de 0 a 10, de acordo com sensações olfativas e sensações retronasal-gustativas. Para as sensações olfativas os seguintes atributos positivos e negativos foram medidos, respectivamente: frutado, tulha/borras, bolor ou mofo/húmido/terra, avinhado/avinagrado/ácido/acre, ranço e madeira húmida, assim como outras sensações negativas, em relação a sensações retronasal-gustativas foram avaliados o frutado, amargo, picante e os atributos negativos já anteriormente referidos. Na elaboração do perfil sensorial, foi avaliada uma amostra dos azeites em estudo em duplicado por sessão de prova. Excluiu-se as variáveis avinhado/avinagrado/ácido/acre, madeira húmida e outros defeitos porque a intensidade destes defeitos nas amostras foi igual a zero.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação das amostras

Após a realização das análises físico químicas e sensoriais, verificou-se que algumas amostras não correspondiam à categoria declarada no rótulo, sendo neste caso necessária uma reclassificação baseada no esquema de decisão proposto pelo Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 para as categorias virgem e virgem extra. As restantes categorias foram adotadas mediante presença de refinação e/ou proveniência de sumo de azeitona ou outro tipo.

Os resultados das reclassificações realizadas encontram-se sumarizados na tabela 5.1, onde se pode verificar a categoria dos azeites com base nos resultados dos parâmetros físico químicos e sensoriais.

Tabela 5.1 - Percentuais de conformidade do produto declarado com a legislação em vigor

Categoria declarada no rótulo		Reclassificação após análise
Virgem Extra (%) (255)	Virgem (%) (94)	
36,9	7,4	Virgem Extra
35,7	44,7	Virgem
27,5	47,9	Outros*

*Classificação adotada para os efeitos deste trabalho.

Todos os azeites reclassificados como virgens extra possuem a análise físico química e a análise sensorial concordante para esta categoria, ou seja tinham todos os parâmetros físico químicos dentro do limite para esta categoria de azeite, ausência total de defeitos sensoriais e uma mediana de frutado maior do que zero.

No caso dos azeites reclassificados como virgens mesmo que muitos parâmetros físico químicos estivessem dentro dos limites do virgem extra, bastava um estar nos limites do azeite virgem para ser considerado virgem. Isto também se aplica à análise sensorial, mesmo que toda a parte físico química possa pertencer a um azeite virgem extra, basta haver um parâmetro sensorial a pertencer aos limites de um azeite virgem e este azeite é rebaixado para virgem.

As amostras reclassificadas como Outros incluem os lampantes (todas aquelas que possuem os parâmetros fora do intervalo dos azeites virgens e não possuem nenhum parâmetro fora dos limites que levante suspeita de refinação, nomeadamente os elevados valores de estigmastadienos nem de adição de óleo de outras origens), os azeites (mistura de azeite virgem com azeite refinado) e ainda azeites adulterados com gordura de outra origem, isto é, que não era proveniente do sumo da azeitona.

Relativamente à conformidade da categoria declarada do azeite com a legislação em vigor, uma observação direta sobre os valores percentuais apresentados na tabela 5.1 permite perceber que um pouco mais de 1/3 (36,9%) das amostras que deram entrada como virgem extra o eram de facto, o que dentre as 255 amostras que entraram como virgem extra representa 94 amostras.

Os dados contidos na tabela 5.1 também permitem afirmar que 44,7% dos azeites que deram entrada como virgens, estavam em conformidade com a categoria virgem.

Os azeites virgens extra foram os que apresentaram maior inconformidade com a reclassificação após análise, uma vez que 63,2% dos azeites que entraram como virgens extra estavam em não conformidade com esta categoria, contudo houve um maior número de amostras que entraram como virgens com presença de defeitos químicos e sensoriais fora dos limites admitidos para o azeite virgem, que davam a indicação de refinação e adição de gorduras de outras origens.

Este facto deve-se à ocorrência de fraudes com o intuito de aumentar o lucro do azeite ou ainda devido à perda da qualidade do azeite ao longo do tempo, que segundo a literatura depende da concentração inicial de antioxidantes naturais e da concentração de ácido oleico, uma vez que quanto maior a concentração destes compostos menor será a degradação do azeite (Bendini et al., 2010; Choe & Min, 2006). Para além de outros fatores, tais como a temperatura, a exposição à luz e a disponibilidade de oxigénio, uma vez que quanto maior a intensidade desses fatores, maior também será a degradação do azeite (Tena et al., 2017).

5.2 Correlação entre análise físico química e análise sensorial

O principal objetivo deste estudo é de averiguar se existem correlações entre a análise físico química e a análise sensorial. À medida que se foram desdobrando os dados do azeite foram sendo descobertas novas correlações, e como tal estas são apresentadas por categoria de azeite.

5.2.1 Azeites virgens extra

Foi construída a tabela 5.2 com as devidas correlações de Spearman entre a análise físico química de azeites virgens extra e a análise sensorial.

De referir que as correlações com significância de 5% são inexistentes para os parâmetros físico químicos do K232, K268, ésteres etílicos, linoleico, linolénico, araquídico, perfil esteróico com exceção do 24-metileno-colesterol e do clerosterol, esteróis totais, NCE42, ceras, ésteres metílicos, monopalmitato de 2-glicerilo e solventes halogenados de azeites virgens extra.

Tabela 5.2 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites virgens extra (n=101)

Atributos sensoriais		Amargo	Picante	Med. Frutado
Critérios de qualidade	Acidez	-0,494	-0,398	-0,346
		0,000	0,000	0,000
	Índice de peróxidos	-0,229	-0,193	-0,118
		0,021	0,053	0,240
	Δ K268	0,474	0,401	0,088
		0,000	0,000	0,382
Critérios de pureza	Estigmastadienos	-0,003	0,024	0,339
		0,976	0,812	0,001
	Mirístico	-0,355	-0,305	-0,090
		0,000	0,002	0,371
	Palmitico	-0,385	-0,266	-0,047
		0,000	0,007	0,641
	Palmitoleico	-0,345	-0,236	-0,058
		0,000	0,018	0,565
	Margárico	-0,253	-0,165	0,106
		0,011	0,099	0,291
	9-Heptadecenóico	-0,311	-0,163	0,127
		0,002	0,103	0,206
	Esteárico	0,252	0,190	-0,025
		0,011	0,057	0,804
	Oleico	0,355	0,240	0,088
		0,000	0,016	0,382
	Gadoleico	-0,242	-0,136	0,092
		0,015	0,175	0,360
	Beénico	-0,298	-0,184	0,006
		0,002	0,065	0,953
Lignocérico	-0,287	-0,144	0,095	
	0,004	0,151	0,345	
Isó.Transoleicos	-0,329	-0,321	-0,011	
	0,000	0,001	0,913	
Isó. Translinoleicos e Translinolénicos	-0,386	-0,384	-0,073	
	0,000	0,000	0,468	
24- Metileno-colesterol*	0,829	-0,088	-0,086	
	0,041	0,868	0,871	
Clerosterol*	-0,086	0,794	0,829	
	0,871	0,059	0,041	
Eritrodiol+uvaol*	-0,371	0,883	0,943	
	0,469	0,020	0,005	

* n=6

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

A primeira grande conclusão que se retira quando se analisa a tabela 5.2 é que dentre os critérios de qualidade das amostras de azeite virgem extra, a acidez se correlaciona negativamente com os atributos sensoriais positivos e o Δ K268 correlaciona-se positivamente.

Estes dados são concordantes com o estudo desenvolvido por Di Loreto e colaboradores (2014) com EVOOs Italianos, onde por meio de PCAs (Análise de componentes principais) encontraram correlações elevadas e negativas entre a acidez, o índice de peróxidos e os atributos sensoriais positivos. Somente a correlação positiva encontrada neste estudo entre o Δ K268 e a

análise sensorial é discordante dos resultados apresentados por estes autores, uma vez que a correlação também foi negativa.

De facto, verifica-se que existe associação negativa fraca/moderada entre a acidez e o amargo ($r=-0,494$; $p=0,000$), por um lado, e o picante e a mediana do frutado ($r=-0,398$; $p=0,000$ e $r=-0,346$; $p=0,000$, respectivamente), por outro. Também se observou que existe uma associação positiva fraca/moderada e direta entre o $\Delta K268$ e o amargo e picante ($r=0,474$; $p=0,000$ e $r=0,401$; $p=0,000$, respectivamente).

Contrariamente àquilo que seria espectável dentre os critérios de pureza tem-se uma correlação positiva fraca/moderada para um nível de significância de 0,05 entre os estigmastadienos e a mediana do frutado ($r=0,339$; $p=0,001$).

Este achado contraria os resultados obtidos no estudo com os EVOOs Italianos que concluiu que os estigmastadienos correlacionavam-se negativamente com o amargo, o frutado e o picante (Di Loreto et al., 2014).

As correlações mais fortes observam-se positivamente entre o perfil esteróico de azeites virgens extra e a análise sensorial, este facto é também evidenciado pela correlação direta moderada/forte entre o 24-metileno-colesterol e o amargo ($r=0,829$; $p=0,041$), o clerosterol e a mediana do frutado ($r=0,829$; $p=0,041$) e entre o uvaol+eritrodiol e o picante ($r=0,883$; $p=0,020$) e a mediana do frutado ($r=0,943$; $p=0,005$). Logo é possível afirmar que a alteração do 24-metileno-colesterol, do clerosterol e do uvaol e eritrodiol provoca uma alteração dos parâmetros organolépticos positivos do azeite como o amargo, o picante e a mediana do frutado.

Para um nível de significância de 0,05, existem evidências estatísticas para se afirmar que alguns parâmetros físico químicos de pureza (24-metileno-colesterol, clerosterol e uvaol+eritrodiol) e parâmetros sensoriais (amargo, picante e mediana do frutado) apresentaram coeficientes de correlação significativos, superiores a 0,75 (Tabela 5.2).

Era expectável que não existisse correlações entre os parâmetros físico químicos e os parâmetros sensoriais negativos do azeite, uma vez que estes são inadmissíveis por lei em azeites com características de virgem extra.

5.2.2 Azeites virgens

Na tabela 5.3 são apresentadas as correlações obtidas para a categoria de azeites virgens.

Tabela 5.3 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico-químicos de qualidade e pureza de azeites virgens (n=133)

	Atributos sensoriais	Amargo	Picante	Med. Frutado	Tulha	Bolor	Ranço	Mediana dos defeitos
Critérios de qualidade	Acidez	-0,283	-0,357	-0,234	0,180	0,141	0,065	0,176
		0,000	0,000	0,007	0,038	0,105	0,457	0,043
	Índice de peróxidos	-0,329	-0,260	-0,292	0,037	0,159	0,100	0,059
		0,000	0,003	0,000	0,672	0,068	0,252	0,500
	K268	-0,214	-0,098	-0,121	-0,016	0,122	0,190	-0,032
	0,013	0,262	0,165	0,855	0,162	0,028	0,715	
	Δ K268	0,255	0,091	0,224	0,056	0,120	0,067	0,187
		0,003	0,298	0,010	0,522	0,169	0,444	0,031
Critérios de pureza	Estigmastadienos	-0,212	-0,129	-0,209	0,051	-0,074	0,063	0,006
		0,014	0,139	0,016	0,560	0,397	0,471	0,945
	Mirístico	-0,256	-0,241	-0,039	-0,019	-0,308	0,103	-0,149
		0,003	0,005	0,656	0,828	0,000	0,238	0,087
	Palmitico	-0,173	-0,170	0,043	-0,188	-0,099	0,168	-0,168
		0,046	0,050	0,623	0,030	0,257	0,053	0,053
	Margárico	-0,222	-0,256	-0,078	-0,008	0,028	0,045	-0,050
		0,010	0,003	0,372	0,927	0,749	0,607	0,568
	9-Heptadecenóico	-0,225	-0,259	-0,054	-0,018	0,031	0,088	-0,034
		0,009	0,003	0,537	0,837	0,723	0,314	0,698
	Esteárico	0,153	0,181	-0,032	0,124	0,063	-0,152	0,104
		0,079	0,037	0,715	0,155	0,471	0,081	0,234
	Oleico	0,004	0,029	-0,112	0,272	0,057	-0,066	0,210
		0,964	0,740	0,199	0,002	0,515	0,450	0,015
	Linoleico	0,199	0,195	0,138	-0,195	0,042	-0,071	-0,088
		0,022	0,024	0,113	0,024	0,631	0,417	0,314
	Linolenico	-0,419	-0,455	-0,351	0,090	-0,021	0,019	-0,070
		0,000	0,000	0,000	0,303	0,810	0,828	0,423
	Isó.Transoleicos	-0,456	-0,322	-0,394	-0,008	-0,330	0,131	-0,168
		0,000	0,000	0,000	0,927	0,000	0,133	0,053
	Isó. Translinoleicos e Translinolénicos	-0,105	-0,041	-0,118	0,036	-0,282	0,057	-0,030
		0,229	0,470	0,176	0,681	0,001	0,515	0,732
	Campesterol*	0,300	0,300	0,462	-0,051	-0,872	-0,894	-0,400
	0,564	0,564	0,356	0,935	0,054	0,041	0,505	
Estigmasterol*	-1,000	-1,000	-0,975	0,821	0,154	0,671	0,900	
	-	-	0,005	0,088	0,805	0,215	0,037	
24-Metileno-colesterol*	0,400	0,400	0,564	-0,205	-0,872	-0,894	-0,300	
	0,432	0,432	0,244	0,741	0,054	0,041	0,624	
Delta -7-Estigmastenol*	0,900	0,900	0,872	-0,667	-0,154	-0,671	-1,000	
	0,037	0,037	0,054	0,148	0,771	0,145	-	
Solventes Halogenados*	-0,714	-0,609	-0,638	0,725	-0,820	-0,338	-0,377	
	0,111	0,199	0,173	0,103	0,046	0,512	0,461	
Ceras**	-0,900	-0,900	-0,975	0,564	0,564	0,894	0,800	
	0,037	0,037	0,005	0,322	0,322	0,041	0,104	
NCE42***	0,203	0,060	0,363	-0,052	0,135	-0,023	-0,085	
	0,257	0,740	0,038	0,774	0,454	0,899	0,638	

NCE42 – número de carbonos equivalente a 42

* n=6

** n=5

*** n=33

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

À semelhança do que acontece com os azeites virgens extra, as correlações são mais baixas entre os parâmetros da qualidade e a análise sensorial de azeites virgens. Tal e qual ao observado com os azeites virgens extra a correlação é negativa fraca/moderada entre a acidez e o índice de peróxidos com todos os descritores sensoriais positivos.

Estes resultados corroboram com os dados da literatura que referem correlações negativas da acidez e índice de peróxidos com todos os atributos positivos do azeite (Di Loreto et al., 2014).

A tabela 5.3 permite concluir que as correlações mais fortes existem entre dois componentes do perfil esteróico de azeites virgens, sendo estas, entre o delta-7-estigmastenol e o amargo e picante ($r=0,900$; $p=0,037$) e entre o estigmasterol e a mediana do frutado ($r=-0,975$; $p=0,005$). As amostras analisadas apresentaram baixos teores de estigmasterol, uma vez que o valor médio deste esterol é de 0,82%.

Este resultado está de acordo com a literatura, que refere que o estigmasterol é o principal esterol relacionado com vários parâmetros de qualidade do azeite virgem. Elevados níveis deste esterol está correlacionado com elevada acidez e baixa qualidade organoléptica. Quando as amostras apresentam baixos teores de estigmasterol é indicativo de que o azeite é proveniente de frutos sadios (Manai-djebali et al., 2018; Noorali et al., 2014; Yorulmaz & Konuskan, 2017).

As ceras estão inversamente correlacionadas com todos os atributos sensoriais positivos como o amargo ($r=-0,900$; $p=0,037$), o picante ($r=-0,900$; $p=0,037$) e a mediana do frutado ($r=-0,975$; $p=0,005$).

Ainda entre os parâmetros de pureza a tabela 5.3 evidencia uma correlação inversa fraca/moderada entre o linolénico e todos os atributos sensoriais positivos, a citar o amargo ($r=-0,419$; $p=0,000$), o picante ($r=-0,455$; $p=0,000$), e a mediana do frutado ($r=-0,351$; $p=0,000$), e entre os isómeros transoleicos e igualmente todos os descritores positivos sensoriais, sendo estes o amargo ($r=-0,456$; $p=0,000$), o picante ($r=-0,322$; $p=0,000$) e a mediana do frutado ($r=-0,394$; $p=0,000$).

Ainda sobre a tabela 5.3 conclui-se que os defeitos das amostras de azeite virgem (seja qual for a hipótese ou a variável em estudo) se correlacionam positivamente com os critérios de qualidade e negativamente com os critérios de pureza. À exceção da correlação média-forte entre as ceras e o ranço ($r=0,894$; $p=0,041$), entre o estigmasterol e a mediana dos defeitos ($r=0,900$; $p=0,037$) e a correlação média entre o ácido oleico e a tulha ($r=0,272$; $p=0,002$) e entre o ácido oleico e a mediana dos defeitos ($r=0,210$; $p=0,015$).

De acordo com o verificado na tabela 5.3 as correlações mais fortes entre azeites virgens e os atributos sensoriais negativos também são entre o perfil esteróico, uma vez que o 24-metileno-colesterol e o campesterol ($r=-0,894$; $p=0,041$) se correlacionam negativamente com o ranço e o estigmasterol positivamente com a mediana dos defeitos ($r=0,900$; $p=0,037$), entre as ceras que se correlacionam positivamente com o ranço ($r=0,894$; $p=0,041$), e para além disso entre os solventes halogenados que correlacionam-se negativamente com o bolor ($r=-0,820$; $p=0,046$).

Após uma observação direta aos dados, verifica-se que à medida que o estigmasterol aumenta, a intensidade da mediana dos defeitos é maior. Esta correlação positiva entre o estigmasterol e a mediana dos defeitos é corroborada pela literatura, como já referido anteriormente, este esteroide em elevadas quantidades está relacionado com uma má qualidade do azeite (Manai-djebali et al., 2018; Noorali et al., 2014; Yorulmaz & Konuskan, 2017).

A correlação positiva entre as ceras e o defeito oxidativo (ranço) pode dever-se a uma consequência tecnológica resultante de uma temperatura de armazenamento que foi sujeita a uma acentuada diminuição (temperaturas próximas de 0°C), provocando uma mudança do estado físico do azeite devido à cristalização de ceras e de TAG mais saturados, o que resulta na desestabilização tanto das micro-gotículas de água como das moléculas fenólicas polares e na perda da disponibilidade de compostos antioxidantes, provocando a redução da proteção natural contra a oxidação lipídica (Bendini et al., 2010).

Atendendo a que quanto mais próximo o coeficiente de Spearman estiver dos seus limites intervalares (-1 e 1) e quanto menor for o p-value maior será a associação entre as variáveis, então dentre os critérios de qualidade de azeites virgens destacam-se a associação fraca/moderada que existe entre a acidez e o picante ($r=-0,357$; $p=0,000$) e o índice de peróxidos e o amargo ($r=-0,329$; $p=0,000$). Ao comparar os resultados verificamos que a associação é negativa entre os parâmetros de qualidade de azeites virgens e os descritores positivos, mas é positiva se os descritores sensoriais forem negativos.

Pelo contrário não se verificou serem estatisticamente significativas ($p>0,05$) outras correlações entre alguns parâmetros físico químicos e sensoriais como por exemplo o K232, ésteres etílicos, palmitoléico, araquídico, gadoleico, beénico lignocérico, perfil esteróico com exceção do Delta-7-estigmastenol, do estigmasterol e do 24-metileno-colesterol, esteróis totais e eritrodioleol de azeites virgens.

Dentre o perfil esteróico não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa para o Δ -5-avenasterol. Este é o precursor na biossíntese do β -sitosterol, por isso estes dois esteróis estão fortemente e negativamente correlacionados. Para além disso o Δ -5-avenasterol tem atividade antioxidante, fazendo com que o azeite seja mais estável contra a oxidação (Manai-djebali et al., 2018). Por isso faz todo o sentido que a correlação entre o Δ -5-avenasterol, embora não seja estatisticamente significativa, seja negativa com os defeitos oxidativos, nomeadamente, o ranço ($r=-0,447$; $p=0,374$) e seja positiva entre β -sitosterol e o ranço ($r=0,447$; $p=0,374$).

Contudo, há que considerar os casos em que não foi possível determinar correlações, devido a valores analíticos obtidos iguais a zero como é o caso do brassicasterol e delta-5,23-estigmastadienol ou devido a análises insuficientes, a citar o caso dos ésteres metílicos e do monopalmitato de 2-glicerilo de azeites virgens.

As amostras de VOO analisadas continham concentrações baixas de ésteres etílicos, cujo valor médio foi de 22 mg/kg, inferior ao limite legal de 35 mg/kg para EVOO, razão pela qual não houve correlações estatisticamente significativas. Para além de que os ésteres alquílicos (soma dos ésteres metílicos e etílicos) cujo valor médio é 29 mg/kg também se encontra dentro do limite de 75 mg/kg.

Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura, uma vez que a correlação entre os ésteres etílicos e defeitos fermentativos como a tulha/borras, mofo/húmido/terra e avinhado/avinagrado foi verificada a partir de concentrações de 430 mg/kg. A concentrações mais baixas foram observadas a existência de outros defeitos, nomeadamente quando a concentração de ésteres etílicos foi de 88 mg/kg a amostra tinha ranço, contudo os ésteres etílicos e alquílicos não se relacionam com defeitos que descrevem a oxidação (Gómez-Coca et al., 2012).

Di Serio et al. (2017) demonstraram resultados que estão de acordo com os reportados por Gómez-Coca et al., contudo estas correlações foram verificadas com concentrações de ésteres etílicos inferiores às existentes no presente trabalho.

5.2.3 Azeites lampantes

A tabela 5.4 indica, contrariamente ao observado até o momento, que as correlações mais fortes são negativas e estão entre os critérios de qualidade, nomeadamente a acidez de azeites lampantes e os atributos sensoriais positivos.

Novamente para os azeites lampantes, verifica-se uma tendência para associações positivas entre os critérios da qualidade e os parâmetros sensoriais negativos e associações negativas entre os critérios da qualidade e os parâmetros sensoriais positivos. A esta regra excetuam-se as correlações existentes entre o K232 e a análise sensorial, quer seja com os defeitos sensoriais, nomeadamente a tulha e mediana de defeitos ($r=-0,357$; $p=0,003$) quer com os descritores positivos, a exemplo a mediana do frutado ($r=0,265$; $p=0,030$).

Tal como espectável o índice de peróxidos correlaciona-se positivamente com o ranço de azeites lampantes ($r=0,290$; $p=0,017$), isto ocorre porque os compostos iniciais da lipoperoxidação são detetados na titulação iodométrica e ao longo da reação estes mesmos compostos irão sofrer alterações que tornam possível na fase de terminação a percepção organoléptica do ranço.

Tal situação deve-se ao facto da análise do índice de peróxidos permitir a deteção da oxidação inicial, quando os hidroperóxidos estão a aumentar, mas o azeite ainda não está rançoso, nos estágios avançados da oxidação os hidroperóxidos diminuem e o azeite fica rançoso (Aparicio et al., 2012).

Tabela 5.4 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites lampantes (n=67)

Atributos sensoriais		Tulha	Bolor	Ranço	Amargo	Picante	Med. Frutado	Med. Defeitos
Critérios de qualidade	Acidez	0,555	0,239	0,100	-0,735	-0,725	-0,720	0,590
		0,000	0,051	0,421	0,000	0,000	0,000	0,000
	Índice de peróxidos	-0,181	0,173	0,290	-0,073	-0,040	0,046	-0,189
		0,143	0,162	0,017	0,557	0,748	0,712	0,126
	K232	-0,357	0,060	0,171	0,118	0,159	0,265	-0,357
		0,003	0,630	0,166	0,342	0,199	0,030	0,003
Critérios de pureza	Estigmastadienos	-0,259	-0,339	-0,163	0,349	0,332	0,279	-0,284
		0,034	0,005	0,188	0,004	0,006	0,022	0,020
	Palmitico	0,217	-0,092	-0,166	-0,377	-0,342	-0,278	0,169
		0,078	0,459	0,179	0,002	0,005	0,023	0,172
	Palmitoleico	0,308	-0,052	-0,255	-0,328	-0,332	-0,291	0,268
		0,011	0,676	0,037	0,007	0,006	0,017	0,028
	Margárico	0,077	-0,088	-0,059	-0,332	-0,316	-0,206	-0,018
		0,536	0,479	0,635	0,006	0,009	0,094	0,885
	9-Heptadecenóico	0,236	-0,047	-0,125	-0,476	-0,468	-0,364	0,163
		0,055	0,706	0,314	0,000	0,000	0,002	0,188
	Esteárico	-0,262	0,008	0,022	0,521	0,487	0,477	-0,300
		0,032	0,949	0,860	0,000	0,000	0,000	0,014
	Linoleico	-0,436	-0,100	0,275	0,155	0,249	0,239	-0,404
		0,000	0,421	0,024	0,210	0,042	0,051	0,001
	Linolenico	0,152	-0,091	0,021	-0,453	-0,424	-0,342	0,125
		0,219	0,464	0,866	0,000	0,000	0,005	0,314
Araquídico	-0,174	-0,112	0,200	0,209	0,239	0,258	-0,227	
	0,159	0,367	0,105	0,090	0,051	0,035	0,065	
Gadoleico	0,046	0,017	0,150	-0,270	-0,213	-0,245	0,126	
	0,712	0,891	0,226	0,027	0,084	0,046	0,310	
NCE42*	0,407	0,183	0,101	-0,430	-0,531	-0,556	0,404	
	0,149	0,531	0,731	0,125	0,051	0,039	0,152	

NCE42 – número de carbonos equivalente a 42

* n=14

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

No que diz respeito aos critérios de pureza, observamos que o NCE42 se correlaciona negativamente com a mediana de frutado ($r=-0,556$; $p=0,039$) assim como também verifica-se uma correlação positiva média entre o ácido esteárico e o amargo ($r=0,521$; $p=0,000$).

Ainda verifica-se que os estigmastadienos de azeites lampantes correlacionam-se positivamente com os parâmetros sensoriais positivos, a citar o amargo ($r=0,349$; $p=0,004$), o picante ($r=0,332$; $p=0,006$) e a mediana do frutado ($r=0,279$; $p=0,022$) e negativamente com os descritores sensoriais negativos, nomeadamente, tulha ($r=-0,259$; $p=0,034$), bolor ($r=-0,339$; $p=0,005$) e mediana dos defeitos ($r=-0,284$; $p=0,020$).

À semelhança dos estigmastadienos, correlacionam-se negativamente com a tulha o ácido esteárico ($r=-0,262$; $p=0,032$) e o linoleico ($r=-0,436$ $p=0,000$).

Segundo indicações da literatura científica a tulha é originada pela concentração elevada de álcoois resultantes do catabolismo de aminoácidos, como a valina e a leucina. Posteriormente estes compostos são convertidos em compostos voláteis que influenciam o odor do azeite,

nomeadamente o 2-butanol e 2-metil-3-buten-2-ol, isobutanol, 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol (Procida et al., 2005).

A correlação negativa dos estigmastadienos com os defeitos sensoriais deve-se ao facto de que estes são o indicador analítico da refinação a que muitos azeites são submetidos para correção tanto química como para eliminação de defeitos sensoriais (Méndez et al., 2005).

Há que referir a correlação positiva entre o linoleico e o ranço ($r=0,275$) para um nível de significância de 0,024 e negativa entre o palmitoleico e o ranço ($r=-0,255$) para um nível de significância de 0,037.

A correlação direta entre o ácido linoleico e o ranço é expectável, uma vez que percentagens elevadas de ácidos gordos polinsaturados (linoleico e linolénico) podem contribuir para a diminuição do prazo de validade do azeite, devido à formação de compostos com ligações duplas conjugadas, a partir dos quais se formam produtos de oxidação voláteis com aroma indesejável característico de ranço. As taxas relativas de oxidação para os ácidos linolénico, linoleico e oleico são, aproximadamente, 20:10:1, respectivamente. A estereoquímica dos ácidos gordos também influencia a velocidade de oxidação, pois os isómeros *cis* oxidam mais rapidamente do que os isómeros *trans* e as ligações duplas conjugadas são mais reactivas que as não conjugadas (Matos, 2003).

Os critérios de pureza possuem uma correlação inversa com a mediana dos defeitos para um nível de significância de 0,05, à exceção do palmitoleico. Nos azeites lampantes os restantes critérios de pureza relacionam-se negativamente com os parâmetros sensoriais positivos, contudo contrariam essa tendência o ácido esteárico, o linoleico e o araquídico.

De salientar que as análises do perfil esteróico, ésteres metílicos, monopalmitato de 2-glicerilo são inexistentes e que as análises dos solventes halogenados e ésteres etílicos de azeites lampantes não foram suficientes. Não foram encontradas correlações com significância de 5% para os parâmetros físico químicos do K268, Δ K268, mirístico, oleico, beénico, lignocérico, isómeros transoleicos, isómeros translinolénicos e translinoleicos e ceras de azeites lampantes.

O nível de ésteres etílicos pode estar relacionado com defeitos de VOO. De facto, em níveis baixos, os ésteres etílicos contribuem para o sabor do azeite (Kalua et al., 2007) enquanto que em níveis mais elevados estão associados com o defeito de tulha e bolor de azeite virgem (Morales et al., 2005).

5.2.4 Azeites

A tabela 5.5 demonstra-nos que dentre os parâmetros de qualidade somente as extinções correlacionam-se significativamente com os defeitos sensoriais de azeites. A citar temos a correlação média negativa do K232 e a tulha ($r=-0,560$; $p=0,024$) e a mediana dos defeitos ($r=-0,647$; $p=0,007$). Assim como a correlação média negativa entre o K268 e o ranço ($r=-0,572$; $p=0,021$). À semelhança do que acontece com os atributos sensoriais negativos dos azeites as

correlações estatisticamente significantes com o atributos positivos são igualmente negativas, uma vez que a acidez apresenta uma correlação média-forte com o amargo ($r=-0,739$; $p=0,001$), picante ($r=-0,647$; $p=0,007$) e mediana dos defeitos ($r=-0,709$; $p=0,002$).

Tabela 5.5 -Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites (n=16)

Atributos sensoriais		Tulha	Bolor	Ranço	Amargo	Picante	Med. Frutado	Med. Defeitos
Critérios de qualidade	Acidez	0,280	0,015	0,294	-0,739	-0,647	-0,709	0,358
		0,294	0,956	0,269	0,001	0,007	0,002	0,173
	K232	-0,560	-0,275	-0,095	0,321	0,348	0,350	-0,647
		0,024	0,303	0,726	0,225	0,187	0,184	0,007
	K268	0,515	-0,035	-0,572	-0,091	-0,301	-0,044	0,453
	0,041	0,898	0,021	0,737	0,257	0,871	0,078	
Critérios de pureza	Estigmastadienos	0,275	-0,058	-0,302	0,222	0,185	0,213	0,209
		0,303	0,831	0,256	0,409	0,493	0,428	0,437
	Mirístico	0,099	0,398	0,043	-0,558	-0,609	-0,477	0,156
		0,715	0,127	0,874	0,025	0,012	0,062	0,564
	Margárico	-0,642	0,032	0,449	0,075	0,178	0,173	-0,617
		0,007	0,906	0,081	0,783	0,510	0,522	0,011
	9-Heptadecenóico	-0,725	-0,077	0,423	0,112	0,207	0,194	-0,717
		0,001	0,777	0,103	0,680	0,442	0,472	0,002
	Linolénico	-0,615	0,117	0,216	-0,077	-0,033	-0,133	-0,608
		0,011	0,666	0,422	0,777	0,903	0,623	0,012
Gadoleico	0,081	0,631	0,345	-0,639	-0,524	-0,685	0,147	
	0,766	0,009	0,191	0,008	0,037	0,003	0,587	

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

Somente o ranço não possui nenhuma correlação estatisticamente significativa com nenhum critério de pureza de azeites. No entanto existe correlação média-forte negativa entre a tulha e o ácido margárico ($r=-0,642$; $p=0,007$), o ácido 9-heptadecenóico ($r=-0,725$; $p=0,001$) e o ácido linolénico ($r=-0,615$; $p=0,011$). Dentre as correlações estatisticamente significantes o bolor é o único que se correlaciona positivamente com o ácido gadoléico ($r=0,631$; $p=0,009$). À semelhança da tulha, a mediana dos defeitos correlaciona-se negativamente com o ácido margárico ($r=-0,617$; $p=0,011$), o ácido 9-heptadecenóico ($r=-0,717$; $p=0,002$) e o ácido linolénico ($r=-0,608$; $p=0,012$).

É importante referir que não houve análises de ésteres etílicos, de NCE42, ésteres metílicos, de monopalmitato de 2-glicerilo e de solventes halogenados de azeites e que as análises do perfil esteróico de azeites não foram suficientes.

Não foram encontradas correlações com significância de 5% para os parâmetros físico químicos do índice de peróxidos, $\Delta K268$, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico, beénico, lignocérico, isómeros transoleicos, isómeros translinolénicos e translinoleicos e ceras de azeites.

5.2.5 Azeites com adição de óleo

De acordo com a tabela 5.6 o picante somente está associado diretamente com o índice de peróxidos através de uma correlação fraca/moderada ($r=0,404$; $p=0,022$).

Segundo a tabela 5.6 o bolor é o atributo sensorial que mais correlacionado está com os critérios de qualidade de azeites com adição de óleos, estando associado positivamente com a acidez ($r=0,553$; $p=0,001$) e índice de peróxidos ($r=0,498$; $p=0,004$) e negativamente com K232 ($r=-0,375$; $p=0,034$) e K268 ($r=-0,407$; $p=0,021$). Também encontram-se correlações médias positivas entre a mediana do frutado com a acidez ($r=0,547$; $p=0,001$) e com o índice de peróxidos ($r=0,508$; $p=0,003$).

O ranço somente associa-se inversamente com a acidez ($r=-0,353$; $p=0,048$) de azeite com suspeita de adição de óleo.

Esta correlação é contrariada pela literatura, uma vez que esta refere que quanto mais elevada é a acidez, maior será a presença de ranço, isto deve-se ao facto dos ácidos gordos livres serem considerados pró-oxidantes, oxidando-se a uma velocidade superior do que os seus ésteres. Este facto ocorre tendo em conta o efeito catalítico dos grupos carboxílicos na formação de radicais livres. Contudo quando os ácidos gordos livres estão presentes em pequenas quantidades não influenciam a estabilidade oxidativa de forma significativa (Miyashita & Takagi, 1986).

Relativamente aos critérios de pureza de azeites com óleo e ao contrário do verificado até o momento, o bolor é o mais correlacionado dentre os atributos sensoriais negativos. A tulha é o único que não possui associações estatisticamente significantes. Por sua vez o ranço possui apenas uma correlação média inversa com o ECN42 ($r=-0,496$; $p=0,022$).

Entre os atributos sensoriais positivos destacam-se a correlação média negativa entre o linoleico e a mediana do frutado ($r=-0,630$; $p=0,000$) e a correlação média positiva entre este e o ácido oleico ($r=0,615$; $p=0,000$).

Tabela 5.6 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais e os parâmetros físico químicos de qualidade e pureza de azeites com adição de óleo (n=32)

	Atributos sensoriais	Bolor	Ranço	Amargo	Picante	Med. Frutado	Med. Defeitos
Critérios de qualidade	Acidez	0,553	-0,353	0,447	0,348	0,547	0,136
		0,001	0,048	0,010	0,051	0,001	0,458
	Índice de peróxidos	0,498	-0,300	0,427	0,404	0,508	0,186
		0,004	0,095	0,015	0,022	0,003	0,308
	K232	-0,375	0,213	-0,222	-0,203	-0,119	0,291
		0,034	0,242	0,222	0,265	0,517	0,106
Critérios de pureza	K268	-0,407	0,116	-0,248	-0,164	-0,149	0,387
		0,021	0,527	0,171	0,370	0,416	0,029
	ΔK268	-0,344	0,066	-0,165	-0,038	-0,062	0,404
		0,054	0,720	0,367	0,836	0,736	0,022
	Mirístico	-0,562	0,270	-0,394	-0,344	-0,520	-0,184
		0,001	0,135	0,026	0,054	0,002	0,313
Critérios de pureza	Palmítico	0,538	-0,235	0,485	0,397	0,503	-0,056
		0,001	0,195	0,005	0,024	0,003	0,761
	Palmitoleico	0,510	-0,271	0,475	0,419	0,595	0,088
		0,003	0,134	0,006	0,017	0,000	0,632
	Margárico	0,436	-0,272	0,454	0,397	0,473	-0,224
		0,013	0,132	0,009	0,024	0,006	0,218
Critérios de pureza	9-Heptadecenóico	0,516	-0,339	0,468	0,411	0,602	-0,027
		0,003	0,058	0,007	0,019	0,000	0,883
	Esteárico	-0,553	0,120	-0,384	-0,278	-0,418	-0,129
		0,001	0,513	0,030	0,123	0,017	0,482
	Oleico	0,595	-0,261	0,485	0,449	0,615	0,112
		0,000	0,149	0,005	0,010	0,000	0,542
Critérios de pureza	Linoleico	-0,616	0,289	-0,511	-0,476	-0,630	-0,123
		0,000	0,109	0,003	0,006	0,000	0,502
	Araquídico	0,397	-0,254	0,424	0,367	0,445	-0,103
		0,024	0,161	0,016	0,039	0,011	0,575
	Gadoleico	0,627	-0,345	0,521	0,435	0,555	-0,049
		0,000	0,053	0,002	0,013	0,001	0,790
Critérios de pureza	Beénico	-0,562	0,232	-0,469	-0,429	-0,511	0,049
		0,001	0,201	0,007	0,014	0,003	0,790
	Lignocérico	-0,516	0,314	-0,454	-0,404	-0,467	0,144
		0,003	0,080	0,009	0,022	0,007	0,432
	Isó. Transoleicos	-0,514	0,151	-0,518	-0,482	-0,366	0,049
		0,003	0,409	0,002	0,005	0,039	0,790
Critérios de pureza	Isó. Translinoleicos e tranlinolénicos	-0,377	0,229	-0,326	-0,329	-0,337	0,103
		0,033	0,207	0,069	0,066	0,059	0,575
Critérios de pureza	NCE42*	-0,351	-0,496	-0,127	-0,124	-0,223	-0,045
		0,119	0,022	0,583	0,592	0,331	0,846

NCE42 – número de carbonos equivalente a 42

*n=21

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

O frutado é um atributo sensorial positivo do azeite conferido por ésteres constituintes da fruta, entre os quais o metilformato, metilacetato e acetato de etilo. Estes ésteres tornam-se voláteis através da ação da enzima álcool acetil transferase (Salas, 2004).

O amargo está mais correlacionado positivamente com o ácido gadoleico (r=0,521; p=0,002) e negativamente com os isómeros transoleicos (r=-0,518; p=0,002). O picante está mais

fortemente correlacionado negativamente com o linoleico ($r=-0,476$; $p=0,006$) e com os isómeros transoleicos ($r=-0,482$; $p=0,005$).

É importante mencionar que não foram realizadas com as amostras de azeites com óleo análises dos ésteres etílicos, metílicos, perfil esteróico, monopalmitato de 2-glicerilo e solventes halogenados.

Não foram encontradas correlações com significância de 5% para os parâmetros físico químicos dos estigmastadienos, ácido linolénico e ceras de azeites com adição de óleo.

Também é possível concluir que o ácido gadoleico é o parâmetro físico químico mais correlacionado com o bolor ($r=0,627$; $p=0,000$).

5.3 Análise Sensorial

Daqui em diante serão apresentados os resultados obtidos com relação às associações que existem entre os parâmetros sensoriais.

5.3.1 Azeites virgens extra

Uma forte característica dos azeites virgens extra é o facto de serem sensorialmente isentos de qualquer defeito, e como tal, obviamente que as correlações apresentadas na tabela 5.7 são obtidas somente entre os atributos sensoriais positivos.

Tabela 5.7 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites virgens extra

Correlação entre atributos sensoriais (n=101)	
Frutado - Amargo	0,375
	0,000
Frutado - Picante	0,454
	0,000
Amargo - Picante	0,777
	0,000

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

Conclui-se pela tabela 5.7 que o picante está mais correlacionado com o amargo do que com o frutado, uma vez que o picante tem uma associação positiva média-forte com o amargo ($r=0,777$; $p=0,000$) e média com o frutado ($r=0,454$; $p=0,000$). Analogamente, percebe-se uma tendência semelhante com o amargo que possui uma correlação mais forte com o picante ($r=0,777$; $p=0,000$) do que com o frutado ($r=0,375$; $p=0,000$).

O estudo dos compostos presentes na fracção volátil do azeite, por análise do headspace, pode dar informações sobre a composição sensorial do azeite (Garrido-delgado et al., 2015).

A fração volátil de um EVOO é formada principalmente por compostos C6 (aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres) que são derivados da via metabólica da lipoxigenase (Kiritsakis, 1998) e que contribuem também para o odor verde (Aparicio et al., 2012). Estes compostos incluem o hexanal, 2-hexenal, benzaldeído, 1-penten-3-ona, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol e acetato de hexilo, sendo o 2-hexenal e o 1-penten-3-ona, que conferem notas de odor frutado, os principais compostos na fração volátil do azeite (Garrido-delgado et al., 2015).

5.3.2 Azeites virgens

No caso dos azeites virgens, estes permitem uma depreciação sensorial até um determinado nível (3,5), as correlações entre a análise sensorial de azeites virgens são apresentadas na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites virgens (n=133)

Atributos sensoriais	Tulha	Bolor	Ranço	Med. dos defeitos	Med. Frutado	Amargo	Picante
Tulha	1,000	0,041	-0,040	0,706	-0,363	-0,209	-0,274
	-	0,639	0,648	0,000	0,000	0,016	0,001
Bolor	0,041	1,000	0,004	0,285	-0,073	0,052	-0,002
	0,639	-	0,964	0,000	0,404	0,552	0,982
Ranço	-0,040	0,004	1,000	0,028	-0,159	-0,222	-0,168
	0,648	0,964	-	0,749	0,068	0,010	0,053
Mediana dos Defeitos	0,706	0,285	0,028	1,000	0,028	-0,137	-0,220
	0,000	0,000	0,749	-	0,749	0,116	0,011
Mediana do Frutado	-0,363	-0,073	-0,159	-0,330	1,000	0,711	0,696
	0,000	0,404	0,068	0,000	-	0,000	0,000
Amargo	-0,209	0,052	-0,222	-0,137	0,711	1,000	0,865
	0,016	0,552	0,010	0,116	0,000	-	0,000
Picante	-0,274	-0,002	-0,168	-0,220	0,696	0,865	1,000
	0,001	0,982	0,053	0,011	0,000	0,000	-

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

À luz da tabela 5.8 podemos afirmar que as correlações estatisticamente mais significativas são entre os parâmetros sensoriais positivos. À semelhança do que acontece com os azeites virgens extra, o amargo dos azeites virgens também está mais correlacionado com o picante ($r=0,865$; $p=0,000$) do que a mediana do frutado ($r=0,711$; $p=0,000$) e por consequência o picante também está mais associado ao amargo ($r=0,865$; $p=0,000$) do que à mediana do frutado ($r=0,696$; $p=0,000$).

O aroma característico dos VOOs depende de compostos voláteis, muitos dos quais derivam da degradação de ácidos gordos polinsaturados através da via da lipoxigenase, que ocorre durante o processo de extração do azeite (Morales et al., 2013).

Desta forma, o hexanal e 1-hexanol são originados na oxidação do ácido linoleico pela via da lipoxigenase e por ação da enzima ADH (álcool desidrogenase). Por sua vez o (Z)-3-hexenil acetato, o (E)-2-hexen-ol e o (E)-2-hexenal têm sua origem na oxidação do ácido linolénico pela ação da enzima AAT (álcool acetil transferase) (Benincasa et al., 2003).

Os descritores sensoriais positivos de azeites virgens também possuem correlações inversas embora médias com os descritores negativos. Por exemplo a tulha correlaciona-se inversamente com todos os descritores positivos, nomeadamente com a mediana do frutado ($r=-0,363$; $p=0,000$), o amargo ($r=-0,209$; $p=0,016$) e o picante ($r=-0,274$; $p=0,001$). Com a mediana dos defeitos correlacionam-se inversamente a mediana do frutado ($r=-0,330$; $p=0,000$) e o picante ($r=-0,220$; $p=0,011$). O amargo é o único que possui associação inversa estatisticamente significativa com o ranço ($r=-0,222$; $p=0,010$).

O ranço é caracterizado por uma diminuição dos compostos voláteis totais, em particular de álcoois e aldeídos, sendo que um nível crescente de nonanal é uma maneira de diferenciar entre um VOO de boa qualidade de um que está oxidado. Portanto quando maior o nível de nonanal, maior é a oxidação e conseqüentemente o defeito a ranço é mais intenso (Dabbou et al., 2011).

Os descritores sensoriais negativos correlacionam-se tanto entre si como com os descritores sensoriais positivos. As associações entre si estatisticamente significantes são positivas e somente existem entre a mediana dos defeitos com a tulha ($r=0,706$; $p=0,000$) e o bolor ($r=0,285$; $p=0,000$), sendo esta última mais fraca do que a primeira.

Existem compostos voláteis que são responsáveis pelos atributos sensoriais indesejados, isto é pelos defeitos do azeite. É o caso do 1-octen-3-ol (mofo-húmido), butanoato de etila (tulha) e vários aldeídos saturados e insaturados (ranço) (Morales et al., 2005).

5.3.3 Azeites lampantes

Os azeites lampantes possuem sensorialmente uma mediana de defeitos superior a 3,5, sendo o azeite que possui mais defeitos dentre aqueles avaliados pela análise sensorial. Na tabela 5.9 verificamos que existem correlações estatisticamente significativas entre os descritores sensoriais de azeites lampantes.

Tabela 5.9 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites lampantes (n=67)

Atributos sensoriais	Tulha	Ranço	Med. dos defeitos	Med. Frutado	Amargo	Picante
Tulha	1,000	-0,284	0,907	-0,708	-0,663	-0,693
	-	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
Bolor	0,039	0,145	0,189	-0,154	-0,039	-0,068
	0,754	0,242	0,126	0,214	0,754	0,585
Ranço	-0,284	1,000	-0,160	-0,039	-0,079	-0,035
	0,020	-	0,196	0,754	0,525	0,779
Mediana dos Defeitos	0,907	-0,160	1,000	-0,739	-0,672	-0,693
	0,000	0,196	-	0,000	0,000	0,000
Mediana do Frutado	-0,708	-0,039	-0,739	1,000	0,920	0,939
	0,000	0,754	0,000	-	0,000	0,000
Amargo	-0,663	-0,079	-0,672	0,920	1,000	0,975
	0,000	0,525	0,000	0,000	-	0,000
Picante	-0,693	-0,035	-0,693	0,939	0,975	1,000
	0,000	0,779	0,000	0,000	0,000	-

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

Segundo consta na tabela 5.9 somente a tulha se correlaciona tanto entre os descritores negativos como positivos, estando correlacionada inversamente com o ranço ($r=-0,284$; $p=0,020$) e diretamente com a mediana dos defeitos ($r=0,907$; $p=0,000$) e inversamente correlacionada com todos os parâmetros sensoriais positivos, sendo eles, a mediana do frutado ($r=-0,708$; $p=0,000$), o amargo ($r=-0,663$; $p=0,000$) e o picante ($r=-0,693$; $p=0,000$).

O hexanal, que confere um sabor típico a ranço, geralmente está presente em concentrações elevadas no azeite, particularmente no LOO, que contém quantidades aumentadas deste aldeído, o que impede o seu uso como marcador de qualidade do azeite. Pelo contrário o 2-hexenal está presente em quantidades mais baixas no LOO, mas existe em elevadas concentrações nos azeites de categorias mais altas (Garrido-delgado et al., 2015).

Outros compostos associados a atributos indesejáveis estão também presentes em concentrações mais elevadas em LOO, tais como o 2-pentenal, 2-heptenal, octanal, 2-octanol, 1-octen-3-ol, 2-octenal, 2-nonanona, 2-decenal acetaldeído, butanoato de etilo e butanoato de propilo (Garrido-delgado et al., 2015).

A associação direta entre o bolor e o ranço, marcador sensorial da oxidação não é estatisticamente significativa ($r=0,145$; $p=0,242$).

Tal como referido anteriormente, o bolor é o defeito sensorial característico de azeites obtidos de frutos infestados com um grande número de fungos filamentosos e leveduras e armazenados a altas temperaturas e elevada humidade. A razão para o observado neste estudo deve-se ao facto dos fungos filamentosos terem a capacidade de oxidar os ácidos gordos livres em compostos voláteis, como 2-heptanona e 2-nonanona. Por outro lado, as leveduras reduzem

prontamente os compostos carbonílicos (Angerosa, 2000; Morales et al., 2005), que são os compostos voláteis formados na decomposição dos hidroperóxidos (que se formam na reação de oxidação) e que podem modificar o aroma do azeite (Velasco & Dobarganes, 2002). Provavelmente a quantidade de leveduras era maior do que os fungos filamentosos nas azeitonas que originaram as amostras de azeites lampantes, provocando a diminuição da percepção destes defeitos e conseqüente ausência de correlação.

A mediana dos defeitos, assim como a tulha, se correlaciona inversamente com todos os descritores positivos, uma vez que existe uma correlação média-forte com a mediana do frutado ($r=-0,739$; $p=0,000$), amargo ($r=-0,672$; $p=0,000$) e o picante ($r=-0,693$; $p=0,000$). Mais uma vez verifica-se que o amargo está mais associado com o picante ($r=0,975$; $p=0,000$) do que com a mediana do frutado ($r=0,920$; $p=0,000$). Por sua vez existe também uma correlação forte e direta entre a mediana do frutado e o picante ($r=0,939$; $p=0,000$).

O bolor é o único defeito que não possui correlação estatisticamente significativa.

5.3.4 Azeites

A tabela 5.10 indica-nos que dentre os parâmetros sensoriais negativos somente a mediana dos defeitos está fortemente correlacionada diretamente com a tulha ($r=0,976$; $p=0,000$). A correlação passa a inversa quando a comparação é entre o picante e a tulha ($r=-0,610$; $p=0,012$). Obtiveram-se correlações médias inversas entre a mediana dos defeitos e os descritores sensoriais positivos, nomeadamente, o amargo ($r=-0,571$; $p=0,020$) e o picante ($r=-0,666$; $p=0,005$).

Os parâmetros sensoriais positivos possuem correlações estatisticamente significativas entre si, uma vez que existe uma correlação forte e direta entre a mediana do frutado e o amargo ($r=0,906$; $p=0,000$) e picante ($r=0,855$; $p=0,000$). Uma vez mais verifica-se que o amargo está mais fortemente correlacionado com o picante ($r=0,943$; $p=0,000$) do que com a mediana do frutado ($r=0,906$; $p=0,000$).

A literatura refere que o amargo é produzido por soluções aquosas diluídas de várias substâncias como a quinina, a cafeína e muitos alcalóides. Para além de ser o sabor característico do azeite de azeitonas verdes (COI, 2007). Apesar de não contribuir para o gosto amargo, a ocorrência de 1-penten-3-ona está positivamente correlacionada com o sabor amargo, enquanto o cis-3-hexen-1-ol e o hexanal estão correlacionados negativamente. Por sua vez o composto volátil que é correlacionado positivamente com o picante é o 1-pen-3-ona, enquanto o trans-2-hexenal e o hexanal são correlacionados negativamente (Angerosa, 2000).

Tabela 5.10 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites (n=16)

Atributos sensoriais	Tulha	Med. dos defeitos	Med. Frutado	Amargo	Picante
Tulha	1,000	0,976	-0,389	-0,488	-0,610
	-	0,000	0,136	0,055	0,012
Bolor	0,182	0,237	-0,369	-0,345	-0,335
	0,500	0,377	0,160	0,191	0,205
Ranço	-0,328	-0,212	-0,100	-0,193	0,046
	0,215	0,431	0,713	0,474	0,866
Mediana dos Defeitos	0,976	1,000	-0,493	-0,571	-0,666
	0,000	-	0,052	0,020	0,005
Mediana do Frutado	-0,389	-0,493	1,000	0,906	0,855
	0,136	0,052	-	0,000	0,000
Amargo	-0,488	-0,571	0,906	1,000	0,943
	0,055	0,021	0,000	-	0,000
Picante	-0,610	-0,666	0,855	0,943	1,000
	0,012	0,005	0,000	0,000	-

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0,05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

Tal e qual como esperado as correlações são diretas quando são entre parâmetros sensoriais positivos ou quando são entre parâmetros sensoriais negativos. Passam a ser inversas quando as associações são entre os parâmetros sensoriais positivos e negativos.

O bolor e o ranço não possuem correlações estatisticamente significativas.

5.3.5 Azeites com adição de óleo

Conforme apresentado na tabela 5.11 somente o bolor, dentre os defeitos, possui associações estatisticamente significativas com os atributos sensoriais positivos de azeites com adição de óleo, sendo que o bolor está mais correlacionado com o amargo ($r=0,583$; $p=0,000$) do que com a mediana do frutado ($r=0,522$; $p=0,002$) e o picante ($r=0,461$; $p=0,008$) (tabela 5.13).

Mais uma vez observamos a tendência já visualizada anteriormente de que o amargo está mais correlacionado com o picante ($r=0,916$; $p=0,000$) do que com a mediana do frutado ($r=0,806$; $p=0,000$). Assim como também a mediana do frutado está mais relacionado com o amargo do que com o picante ($r=0,750$; $p=0,000$).

As agliconas do ligstrosídeo são responsáveis pelo sabor picante, por isso, os azeites com elevado teor deste composto são mais pungentes (Garcia et al., 2012).

Tabela 5.11 - Correlação de Spearman entre os diversos atributos sensoriais de azeites com adição de óleo (n=32)

Atributos sensoriais	Bolor	Med. Frutado	Amargo	Picante
Tulha	0,109	0,056	-0,216	-0,301
	0,553	0,761	0,235	0,094
Bolor	1,000	0,522	0,583	0,461
	-	0,002	0,000	0,008
Ranço	-0,127	-0,312	-0,192	-0,125
	0,489	0,082	0,292	0,495
Mediana dos Defeitos	0,136	-0,043	-0,187	-0,219
	0,458	0,815	0,305	0,228
Mediana do Frutado	0,522	1,000	0,806	0,750
	0,002	-	0,000	0,000
Amargo	0,583	0,806	1,000	0,916
	0,000	0,000	-	0,000
Picante	0,461	0,750	0,916	1,000
	0,008	0,000	0,000	-

Nota: Valores de correlação significativa apresentados a vermelho (valor-p < 0.05). Por baixo do valor da correlação é apresentado o respetivo valor-p (letra pequena).

5.4 Hierarchical Clusters Analysis

A análise de *clusters* foi realizada com todas as categorias de azeite (casos), e com as variáveis utilizadas (físico químicas e da análise sensorial) nos vários estudos que têm sido feitos até o presente ponto. Este estudo tem o objetivo de perceber se as variáveis físico-químicas (FQ) e da análise sensorial (AS) apresentam resultados em concordância ou não.

Para tal, recorreu-se ao método hierárquico, designado por *Hierarchical Clusters Analysis* (HCA), utilizando o método de Ward com o quadrado da distância euclidiana. Depois de identificadas as amostras a considerar, as variáveis foram todas standardizadas, para anular o efeito das diferentes unidades de medida das variáveis nos resultados finais. Todo o tratamento estatístico foi efetuado utilizando o software Statistica® 7.0.

5.4.1 Parâmetros físico químicos e sensoriais

O primeiro estudo incluiu como variáveis, os parâmetros FQ e da AS. Tendo em consideração a reclassificação após as análises dos azeites, neste estudo foram incluídos os azeites virgens, virgens extra, lampantes e azeites com adição de óleo. Atendendo à falta de informação em alguns azeites / variáveis, num total de 349 amostras apenas foram consideradas válidas para o estudo 328 amostras.

Na figura 5.1 apresenta-se o dendrograma para as 328 amostras, considerando como variáveis os parâmetros físico químicos e da análise sensorial de todas as categorias (azeites virgens, virgens extras, lampantes e azeites com adição de óleo).

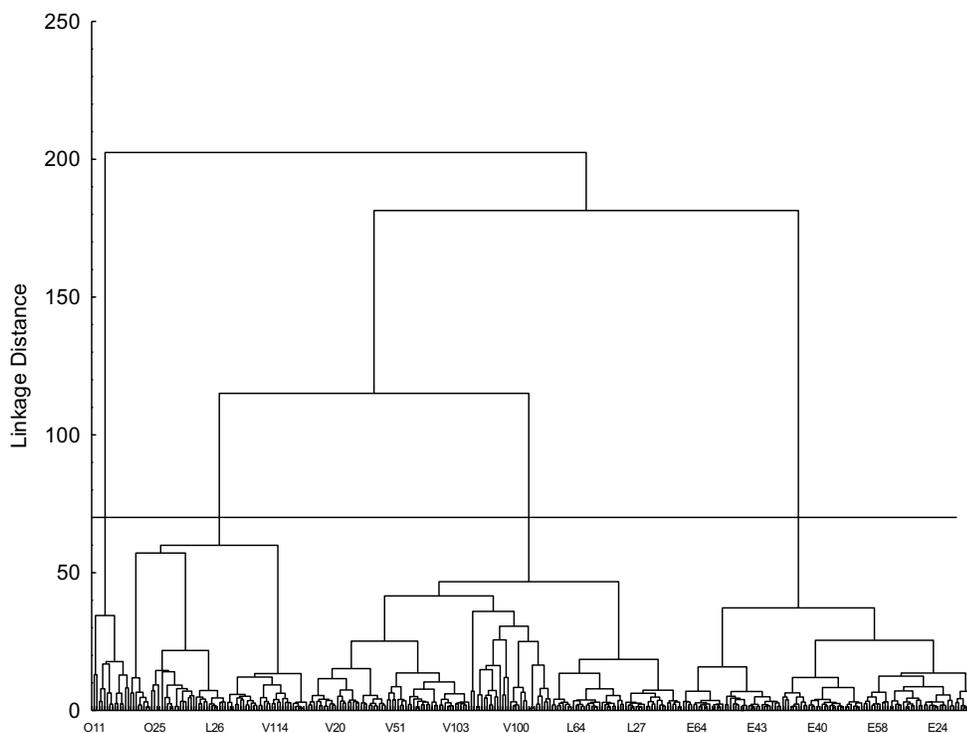


Figura 5.1 - Dendrograma das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward

Particularmente, pela figura 5.1 formam-se 4 *clusters*. O primeiro (da esquerda para a direita) de dimensão reduzida, o segundo de dimensão média e os dois últimos de dimensão elevada. Atendendo ao elevado número de amostras em estudo e à dificuldade em visualizar o conteúdo de cada *cluster*, este irá ser ampliado na sua constituição. Na figura 5.2 é apresentada a ampliação do *cluster* 1 e 2. Nas figuras 5.3 e 5.4 são apresentadas as ampliações dos *cluster* 3 e 4, respetivamente.

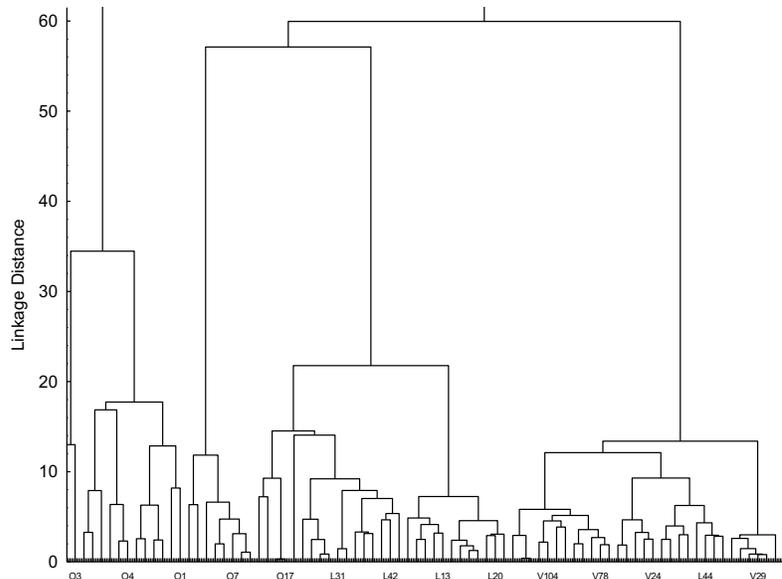


Figura 5.2- Dendrograma com o *cluster* 1 e 2 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward

No *cluster* 1 a formação predominante são azeites com adição de óleos, enquanto o *cluster* 2 já apresenta na sua constituição uma mistura de azeites com adição de óleo e lampantes, terminando (à direita) com uma predominância de azeites virgens.

Verificamos que no *cluster* 2 no agrupamento onde a predominância são azeites lampantes, existe um azeite com adição de óleo (O17) porque os parâmetros sensoriais desta amostra estão dentro dos limites para um azeite lampante.

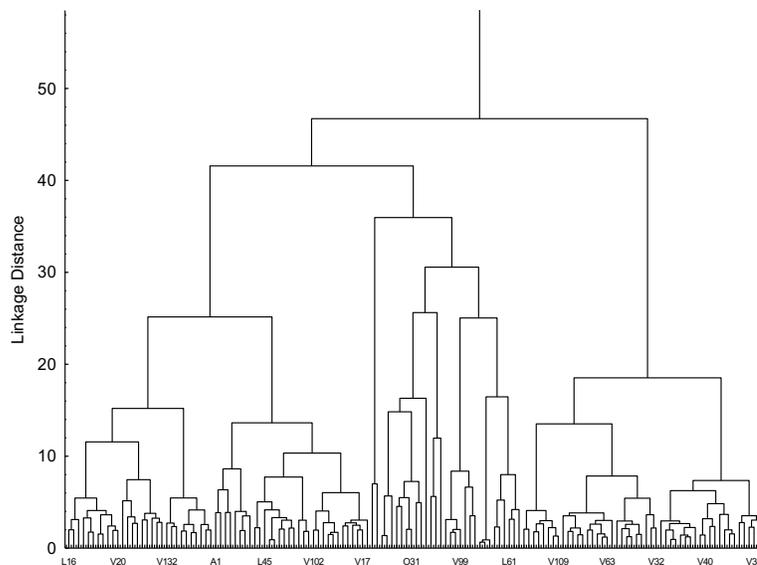


Figura 5.3 - Dendrograma com o *cluster* 3 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward

Como se pode observar na figura 5.3, o *cluster* 3 é formado, predominantemente, por azeites virgens, apresentando também na sua constituição, alguns azeites com adição de óleo e azeites lampantes.

Este *cluster* demonstra que neste agrupamento temos três azeites lampantes (L16, L45 e L61), um azeite (A1) e um azeite com adição de óleo (O31), o que indica que estes azeites possuem parâmetros dentro dos limites de um azeite virgem numa das análises, que para todos os casos é na análise sensorial, o que significa que sensorialmente a intensidade dos defeitos destes azeites não foi suficiente para obter uma mediana de defeitos superior a 3,5.

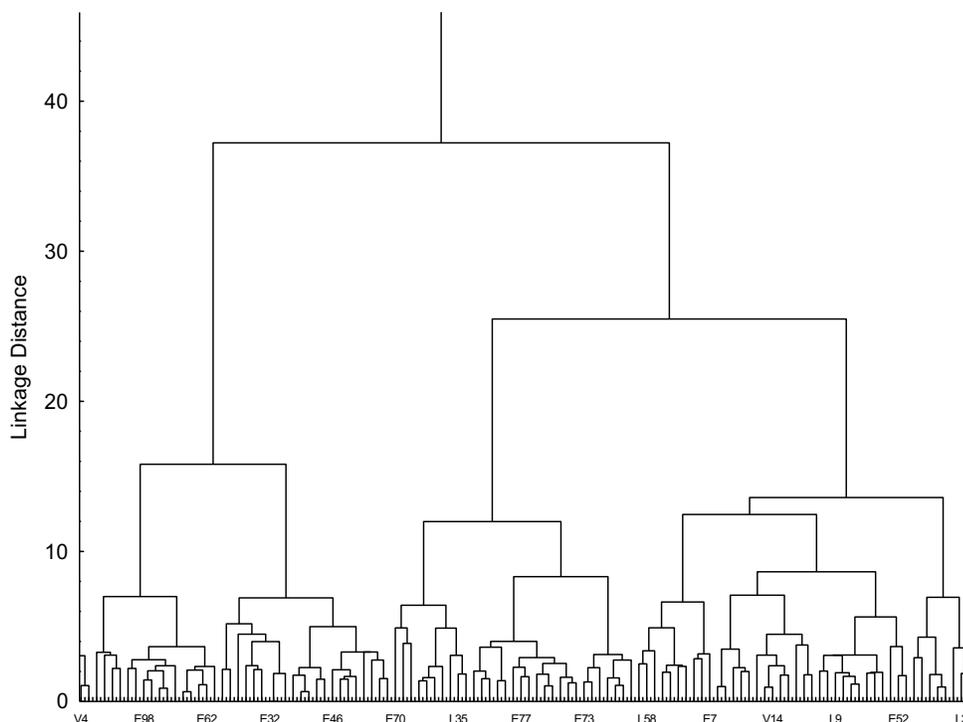


Figura 5.4 - Dendrograma com o *cluster* 4 das variáveis físico químicas e sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward

O último *cluster* da formação do dendrograma, *cluster* 4, é predominantemente formado por azeites virgens extra, embora, à semelhança do *cluster* 3, este também exhibe alguma mistura formada por azeites virgens e lampantes. Este facto pode dever-se às variáveis consideradas neste estudo (físico-químicas e provenientes da análise sensorial). O motivo para esta ocorrência é que tanto os azeites virgens como os lampantes possuem parâmetros que estão dentro do limite dos azeites virgens extra numa das análises.

Esta situação é frequente na base de dados, uma vez que 17 azeites lampantes têm parâmetros que estão dentro dos limites para um azeite virgem extra numa das análises, e o mesmo se verifica em 115 azeites virgens.

5.4.2 Parâmetros físico químicos

Com o intuito de se perceber qual o peso que as variáveis poderão ter na formação dos *clusters*, foram realizados dois estudos complementares, em que o primeiro considerou apenas as variáveis FQ e o segundo as variáveis da AS.

O estudo que se segue considerou as variáveis FQ e a totalidade das amostras, ou seja, as 328 amostras. O dendrograma está representado na figura 5.5.

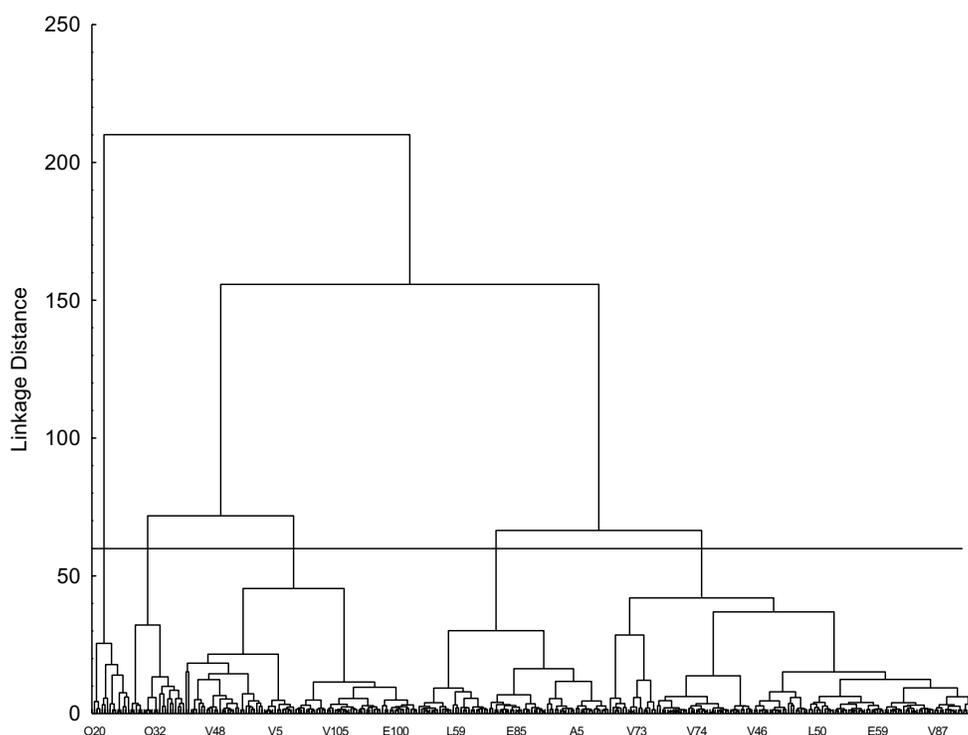


Figura 5.5 - Dendrograma das variáveis físico químicas utilizando o algoritmo do método de Ward

O dendrograma completo, apresentado na figura 5.5, permite identificar a formação de 5 *clusters*. À semelhança do apresentado na figura anterior (figura 5.1), a formação destes *clusters* apresenta alguma mistura de azeites e azeites com adição de óleos na constituição dos respetivos *clusters*. Nas figuras II.1, II.2, II.3 e II.4, presentes no Anexo II, podem-se observar as ampliações dos *clusters* 1 e 2, 3, 4 e 5, respetivamente.

Os *clusters* 1 e 2 possuem azeites com adição de óleo que possuem os parâmetros sensoriais dentro dos limites para os azeites lampantes. O *cluster* 3 agrupa azeites virgens com parâmetros físico químicos dentro dos limites para os virgens extra à exceção do V5 que tem os parâmetros sensoriais dentro do limite para o virgem extra e do V48 que possui todos os parâmetros dentro dos limites do azeite virgem. O *cluster* 4 agrupa azeites com parâmetros sensoriais dentro dos limites dos azeites virgens extra e azeites lampantes em ambas as análises. O *cluster* 5 por sua vez inclui azeites virgens que quimicamente são virgens extra e um azeite lampante que quimicamente é virgem.

5.4.3 Parâmetros sensoriais

Seguidamente foi construído um dendrograma considerando apenas as variáveis da AS, presente na figura 5.6. Foram consideradas 10 variáveis da AS, tendo-se excluído as variáveis avinhado/avinagrado/ácido/acre, madeira húmida e outros defeitos. Das 349 amostras iniciais, neste estudo foram consideradas 328 amostras válidas (as amostras excluídas não apresentavam dados em algumas variáveis).

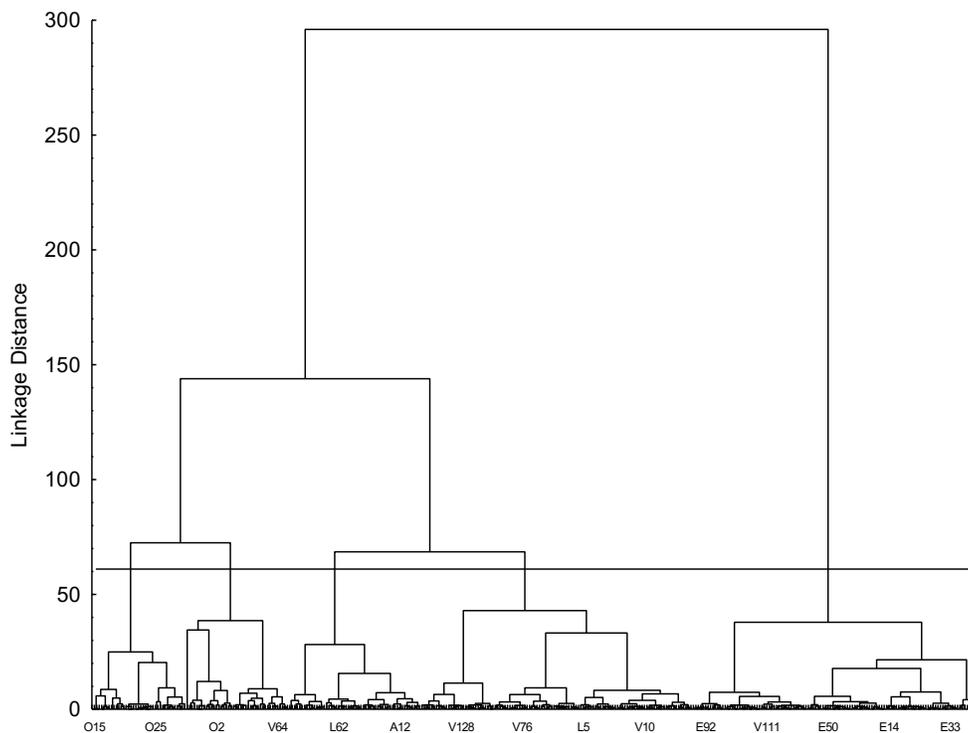


Figura 5.6 - Dendrograma das variáveis sensoriais utilizando o algoritmo do método de Ward

Considerando o corte à mesma distância do efetuado no estudo anterior, onde apenas as variáveis FQ tinham sido consideradas, obtém-se o mesmo número de *clusters*. Embora ainda se

verifique uma mistura de azeites, azeites com adição de óleo e lampantes, especialmente na constituição dos primeiros 3 *clusters*, nos *clusters* 4 e 5, presentes nas figuras II.7 e II.8 do anexo II verifica-se a predominância dos azeites virgens no *cluster* 4 e dos azeites virgens extra no *cluster* 5. À semelhança do estudo anterior, as figuras ampliadas dos *clusters* encontram-se no Anexo II, representadas nas figuras II.5 a II.8.

Mais uma vez no *cluster* 1 encontram-se os azeites com adição de óleo com parâmetros sensoriais dentro dos limites dos azeites lampantes. O *cluster* 2 agrupa azeite virgem que quimicamente é virgem extra e azeite com adição de óleo que sensorialmente é lampante, mas sem defeito, motivo pelo qual é agrupado junto com azeites que quimicamente são virgem extra. No *cluster* 3 encontra-se agrupado um azeite lampante (L62) com parâmetros físico químicos dentro dos limites de azeites virgens e um azeite (A12) com características sensoriais de lampante. No *cluster* 4, onde a predominância são de azeites virgens, aparece um azeite lampante (L5) porque possui parâmetros sensoriais dentro dos limites para um azeite virgem. Por fim no *cluster* 5 onde a predominância é de azeites virgens extra aparece um azeite virgem (V111) porque possui parâmetros físico químicos de um azeite virgem extra.

5.4.4 Parâmetros físico químicos concordantes com os sensoriais

Atendendo às principais conclusões retiradas dos 3 estudos anteriores, considerou-se importante incluir, para o estudo seguinte, apenas as amostras que tenham obtido concordância nas duas análises, a FQ e a AS. Só desta forma será possível obter uma caracterização dos azeites virgens e virgens extra, que possam servir de referência.

Do conjunto total de amostras apenas foram consideradas 140, onde foram incluídos os azeites, azeites com adição de óleo e lampantes.

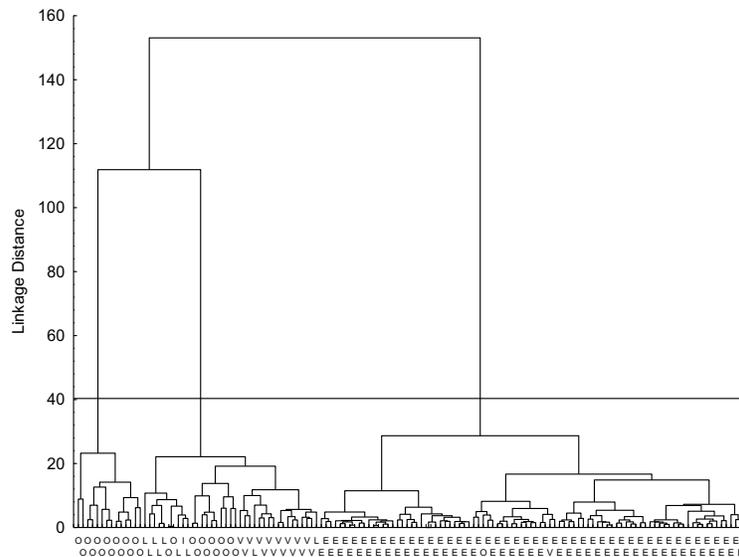


Figura 5.7 - Dendrograma das amostras com concordância na análise físico química e sensorial

O dendrograma apresentado na figura 5.7 permite identificar claramente a formação de 3 *clusters*, sendo o primeiro inteiramente formado por azeites com adição de óleo, o segundo formado por azeites com adição de óleo, azeites lampantes e azeites virgens e o terceiro formado por azeites virgens extra.

De acordo com o espectável, o *cluster* 1 e 2 agrupa uma mistura de azeites com adição de óleo, lampantes e virgens, uma vez que na base de dados temos azeites com adição de óleo com parâmetros sensoriais dentro dos limites de azeites lampantes e de azeites virgens. Contudo, embora no *cluster* 3 a predominância seja de azeite de categoria superior, ainda assim verificam-se alguns azeites com adição de óleos e azeites virgens, que possuem alguma similaridade com os azeites virgens extra, quer pela ausência de defeitos ou por possuir parâmetros dentro dos limites do azeite virgem extra numa das análises.

Este estudo, baseado na análise de *clusters*, vem corroborar o estudo apresentado no ponto anterior relativo às correlações entre as variáveis FQ e da AS.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1 Conclusões

A aplicação de métodos estatísticos e matemáticos com dados de origem química tem um enorme interesse para a indústria alimentar, tendo em conta que a estatística multivariada é uma ferramenta que permite caracterizar, comparar, agrupar e avaliar dados provenientes de matrizes alimentares, como o azeite. Por obrigatoriedade o estudo teve de ser remetido para a estatística não-paramétrica, uma vez que os dados possuem um nível de complexidade superior e uma distribuição anormal.

O grande objetivo deste estudo surge de uma necessidade no sector do azeite de desenvolver ferramentas analíticas para suportar os testes do painel. Desta forma, e recorrendo a ferramentas da estatística multivariada verificou-se que as correlações obtidas não permitem fazer interpretações sensoriais de todos os dados físico químicos, no sentido de poderem substituir a análise sensorial.

As grandes conclusões retiradas das correlações de Spearman é de que alguns parâmetros do perfil esteróico se relacionam com a análise sensorial de azeites virgens extra e virgens sendo as correlações mais fortes nos azeites de categoria superior, muito provavelmente devido ao n ser menor ($n=6$). As outras correlações de maior significado estatístico são dos álcoois triterpénicos (eritrodiool+uvaol), que somente se correlacionam positivamente com o picante e mediana do frutado de azeites virgens extra. Das ceras, que se correlacionam somente com azeites virgens sendo positivamente com os defeitos e negativamente com os atributos sensoriais positivos. Dos solventes halogenados que também só se correlacionam negativamente com o bolor de azeites virgens. Estas correlações acima de 0,800 permitem afirmar que a alteração destes parâmetros físico químicos provocam uma alteração dos parâmetros organoléticos do azeite.

Para além disso verifica-se que as correlações mais fortes de azeites de qualidade superior (virgem extra e virgem) são entre os critérios de pureza e a análise sensorial, contudo à medida que o azeite perde qualidade a tendência é inversa pois as correlações passam a ser mais significativas entre os parâmetros da qualidade e os descritores sensoriais positivos, com exceção dos azeites com adição de óleo.

Contudo, as correlações obtidas na presente dissertação não são suficientes para uma interpretação sensorial dos dados químicos obtidos nas análises físico químicas.

O bolor é o defeito sensorial menos correlacionado com os parâmetros físico químicos de azeites de categoria superior, uma vez que existem mais correlações estatisticamente significativas nos azeites com adição de óleo, embora a correlação mais forte tenha sido com

parâmetros físico químicos de azeites virgens, o que mais uma vez possivelmente deve-se ao facto do n ser muito baixo (n=6).

O ranço está mais correlacionado com critérios de pureza do que com os critérios de qualidade indicativos de oxidação (K268) de azeites virgens. No caso dos azeites lampantes, embora existam mais correlações entre o ranço e os critérios de pureza, a correlação é mais forte com os critérios de qualidade associados à oxidação (índice de peróxidos). No caso dos azeites o ranço correlaciona-se somente com o K268. Nos azeites com adição de óleo o ranço está mais fortemente correlacionado com critérios de pureza (NCE42) do que com os critérios de qualidade (acidez).

A tulha está mais fortemente correlacionada com os critérios de pureza (palmítico, oleico e linoleico) do que com os parâmetros de qualidade (acidez) de azeites virgens. Embora existam mais correlações estatisticamente significativas entre a tulha e os critérios de pureza (estigmastadienos, palmitoleico, esteárico e linoleico), as correlações são mais fortes entre a tulha e os critérios de qualidade (acidez e K232) de azeites lampantes. Os azeites com adição de óleo são os únicos que não possuem correlações estatisticamente significativas.

A mediana dos defeitos correlaciona-se positivamente tanto com os critérios de qualidade (acidez e Δ K268) como de pureza (oleico e estigmasterol) de azeites virgens, estando mais fortemente correlacionado com os critérios de pureza. A mediana dos defeitos de azeites lampantes está mais fortemente correlacionada com os critérios de qualidade (acidez e K232). Existem correlações somente negativas entre a mediana de defeitos e os critérios de qualidade (K232) e pureza (margárico, 9-heptadecenóico e linolénico) de azeites, sendo este último mais fortemente correlacionado. As correlações passam a ser positivas entre os critérios de qualidade (K268 e Δ K268) e a mediana dos defeitos de azeites com adição de óleo.

As grandes conclusões advindas da correlação dos parâmetros sensoriais entre si é que o amargo está mais fortemente correlacionado com o picante do que com a mediana do frutado transversalmente em todas as categorias de azeites. As correlações são positivas entre os parâmetros sensoriais positivos, assim como entre os parâmetros sensoriais negativos. Contudo passa a ser negativa entre parâmetros sensoriais positivos e negativos. Ainda assim, excluem-se a esta regra a correlação negativa do ranço com a tulha de azeites lampantes e da correlação positiva entre a mediana do frutado e o bolor de azeites com adição de óleo.

Por fim, após a análise de *clusters*, concluímos que nos agrupamentos à uma mistura de categorias de azeite, que se agrupam por similaridade de algum parâmetro quer seja químico ou sensorial, isto é, em agrupamentos com predominância de azeite virgem extra podem estar azeites lampantes ou mesmo azeites com adição de óleo, porque quimicamente ou sensorialmente os azeites lampantes podem ser virgem extra ou os azeites com adição de óleo podem não ter defeitos, fazendo com que estejam no mesmo grupo dos azeites virgens extra, mesmo não o sendo.

6.2 *Perspectivas Futuras*

No que toca a melhorias futuras, estas incluem a repetição das correlações entre o perfil esteróico e álcoois triterpénicos, ceras e solventes halogenados com a análise sensorial utilizando um maior número de amostras, para confirmar estas correlações elevadas, uma vez que o número de amostras com estas análises neste estudo foi muito reduzido.

Para trabalhos futuros, está aqui um ponto de partida ou um paralelismo, já que o mesmo pode ser feito utilizando outros parâmetros químicos, nomeadamente os compostos voláteis que têm relação direta específica para cada descritor sensorial e que têm um enorme potencial para permitir uma interpretação sensorial de dados químicos.

BIBLIOGRAFIA

- AFGalimentar. (2018). Azeitona. Obtido 24 de Agosto de 2018, de <http://www.afg.com.pt/alimentar/pages/display/olive/language:PT#blue-bar>
- Akoh, C. C., & Min, D. B. (2002). *Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology* (Vol. 117). New York: Marcel Dekker.
- Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J. J., Uceda, M., Beltrán, G. (2007). How Heating Affects Extra Virgin Olive Oil Quality Indexes and Chemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9646–9654.
- Amelio, M. (2003). Chemical-physical characteristics of olive oils. Obtido 2 de Setembro de 2018, de <http://www.aziendabettini.com/filezip/Chemical%20olive%20oil.pdf>
- Ammar, S., Zribi, A., Mansour, A. B., Ayadi, M., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2014). Effect of Processing Systems on the Quality and Stability of Chemlali Olive Oils. *Journal of Oleo Science*, 63(4), 311–323.
- Andrikopoulos, N. K., Giannakis, I. G., & Tzamtzis, V. (2001). Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. *Journal of Chromatographic Science*, 39(4), 137–145.
- Angerosa, F. (2000). *Sensory quality of olive oils*. In: J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc.
- Aparicio, R. & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 614–627.
- Aparicio, R., & Harwood, J. L. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Madrid, Mundiprensa.
- Aparicio, R., Morales, M. T., & García-González, D. L. (2012). Towards new analyses of aroma and volatiles to understand sensory perception of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(10), 1114–1125.
- Aparicio, R., Rocha, S. M., Delgadillo, I., & Morales, M. T. (2000). Detection of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 853–860.
- Aragüés, R., Puy, J., & Isidoro, D. (2004). Vegetative growth response of young olive trees (*Olea europaea* L., cv. Arbequina) to soil salinity and waterlogging. *Plant and Soil*, 258, 69–80.
- Aragüés, R., Guillén, M., & Royo, A. (2010). Five-year growth and yield response of two young olive cultivars (*Olea europaea* L., cvs. Arbequina and Empeltre) to soil salinity. *Plant and Soil*, 334(1), 423–432.
- Arancibia, C., Jublot, L., Costell, E., & Bayarri, S. (2011). Flavor release and sensory characteristics of o/w emulsions. Influence of composition, microstructure and rheological behavior. *Food Research International*, 44(6), 1632–1641.
- Arias-Calderón, R., Carvalho, M. T., Cordeiro, A. (2017, Abril). A importância dos progenitores no programa de melhoramento da oliveira por hibridação. *Olivicultura*, 6–9.
- ASAE. (sem data). ASAE. Obtido 2 de Setembro de 2018, de <https://www.asae.gov.pt/cientifico->

laboratorial/laboratorio-de-seguranca-alimentar.aspx

- Aued-pimentel, S., Takemoto, E., Kumagai, E. E. , Cano, C. B. (2008). Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a deteção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. *Revista Química Nova*, 31(1), 31–34.
- Barros, A. I., Freire, I., Goncalves, B., Bacelar, E., Gomes, S., Lopes, J., & Martins-Lopes, P. (2013). Evaluation of chemical and phenotypic changes in Blanqueta, Cobrancosa, and Galega during olive fruits ripening. *CyTA - Journal of Food*, 11(2), 136–141.
- Bayarri, M. J., & Berger, J. O. (2000). P Values for Composite Null Models. *Journal of the American Statistical Association*, 95(452), 1127–1142.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* 4ª Edição, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8), 1679–1719.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Lercker, G. (2010). Stability of the Sensory Quality of Virgin Olive Oil during Storage - An Overview. *Italian Food & Beverage Technology*, LX, 5–18.
- Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2003). Assay of Aroma Active Components of Virgin Olive Oils from Southern Italian Regions by SPME-GC / Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 733–741.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 196–214.
- Bešter, E., Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., & Golob, T. (2008). Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry*, 108(2), 446–454.
- Bojanowski, V., & Hummel, T. (2012). Retronasal perception of odors. *Physiology and Behavior*, 107(4), 484–487.
- Boskou, D. (1998). *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*. Madrid: AMV Ediciones.
- Boskou, D. (2006). *Olive Oil - Chemistry and Technology*. 2ª Edição, Champaign, Illinois: (AOCS Press).
- Boskou, D. (2011). *Olive Oil*. In F. Gunstone (Ed.), *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. 2ª Edição, Oxford, England: Wiley-Blackwell, pp. 243–271.
- Burr, M. L. (2001). Reflections on the Diet and Reinfarction Trial (DART). *European Heart Journal, Supplement*, 3(SUPPL.4), 75–78.
- Casa do Azeite. (2018). Denominações de origem protegida. Obtido 20 de Agosto de 2018, de <http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Denominações-de-origem-protegida>
- Chliyeh, M., Touati, J., Selmaoui, K., Touhami, A. O., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., Douira, A. (2014). Bibliographic Inventory of the Olive Tree (*Olea europaea* L.) Fungal Diseases in the World. *Int. J. Pure App. Biosci.*, 2(3), 46–79.

- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169–186.
- Cintra, P. (2014, Março 14). Os Segredos do Ouro Líquido Português. *Jornal Nacional Semanal Sol*, 393, p. 14.
- Civantos, L. (2008). *La olivicultura en el Mundo y en España*. In: Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. & Rallo, L. (Eds.), *El cultivo del olivo*. 6ª Edição, Madrid: MundiPrensa, pp. 17-36.
- Codex Alimentarius. (2001). Codex standard for olive oil, virgin and refined, and for refined olive-pomace oil. *Codex stan 33, 8*, 25–39.
- Codex Alimentarius. (2013). Standard for olive oils and olive pomace oils. *Codex Stan 33*, 1–9.
- COI - Internacional Olive Council. (2017). 106e session du Conseil des Membres du COI. *Newsletter - Marché Oléicole N° 121*, 1–5.
- COI - International Olive Council. (2007). Sensory Analysis: general basic vocabulary. *COI/T.20/Doc.4/rev.1, September 2007*.
- COI - International Olive Council. (2015). Trade Standard Applying To Olive Oils and Olive-Pomace Oils. *COI / T.15 / NC no. 3 / Rev. 3, November 2008*.
- Correia, M. P. (2008). A cozinha é uma Alquimia. *Revista da Casa do Azeite*, 14, 1–48.
- Croux, C., & Dehon, C. (2010). Influence functions of the Spearman and Kendall correlation measures. *Statistical Methods and Applications*, 19(4), 497–515.
- Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., Oliveira, M. B. P. (2006). Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351–3356.
- Dabbou, S., Dabbou, S., Selvaggini, R., Urbani, S., Taticchi, A., Servili, M., & Hammami, M. (2011). Comparison of the chemical composition and the organoleptic profile of virgin olive oil from two wild and two cultivated Tunisian olea europaea. *Chemistry and Biodiversity*, 8(1), 189–202.
- De Lacroix, E. L. (2003). Olive oil sector in the European Union. Obtido 21 de Agosto ed 2018 em http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/oliveoil/2003_en.pdf, pp. 1–6.
- De Santis, D., & Frangipane, M. T. (2015). Sensory Perceptions of Virgin Olive Oil. New Panel Evaluation Method and the Chemical Compounds Responsible. *Natural Science*, 3, 132-142.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. 2ª Edição, England: John Wiley & Sons, LTD.
- Di Loreto, G., Giansante, L., Alfei, B., Di Giacinto, L. (2014). Alchil esteri ed altri indicatori per la tutela della qualità e della genuinità degli oli extra vergini italiani. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 91, 35–45.
- Di Serio, M. G., Giansante, L., Di Loreto, G., Faberi, A., Ricchetti, L., & Di Giacinto, L. (2017). Ethyl esters versus fermentative organoleptic defects in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 219, 33–39.
- Esposito, S., Taticchi, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Veneziani, G., Di Maio, I., Servili, M. (2017).

Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition. *Food Chemistry*, 229, 726–733.

- Esteves, E. (2009). Introdução à Estatística Aplicada e Estatística Descritiva, Obtido 13 de Agosto de 2018, de <http://w3.ualg.pt/~eesteves/docs/EstatisticaDescritiva09.pdf>, pp. 1–15.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Martínez-González, M. A. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279–1290.
- EU Horizon 2020. (2014). WORK PROGRAMME 2014-2015. Authentication Of Olive Oil. Obtido 27 de Agosto de 2018, de http://ec.europa.eu/research/horizon2020/pdf/work-programmes/food_draft_work_programme.pdf#view=fit&pagemode=none
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry*. 3ª Edição, Taylor & Francis. Obtido 14 de Agosto de 2018, de <https://books.google.pt/books?id=1OhFPZ7tFz8C>
- Fernandes, M. W. S., Falcão, H. A. S., & Almeida, S. G. (2010). Índice de peróxido e de acidez em óleos de fritura de uma rede de fast food do Distrito Federal. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*, 13(16), 9–20.
- Ferreira, L., & Hitchcock, D. B. (2009). A comparison of hierarchical methods for clustering functional data. *Communications in Statistics: Simulation and Computation*, 38(9), 1925–1949.
- Frankel, E. N., Mailer, R. J., Schoemaker, C. F., Wang, S. C., & Flynn, J. D. (2010). Tests indicate that imported “extra virgin”olive oil often fails international and USDA standards. *Robert Mondavi Institute for Wine and Food Science*, (July), pp. 1–10.
- Freitas, D. C. P. (2013). *Caracterização fenólica de azeites virgens provenientes da cultivar Galega Vulgar e validação do método por HPLC. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária*. Instituto Politécnico de Beja.
- Gámbaro, A., Raggio, L., Ellis, A. C., & Amarillo, M. (2014). Virgin olive oil color and perceived quality among consumers in emerging olive-growing countries. *Grasas y Aceites*, 65(2), e023.
- Garcia-Gonzalez, D. L., & Aparicio, R. (2010). Research in olive oil: Challenges for the near future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12569–12577.
- García-González, D. L., Romero, N., & Aparicio, R. (2010). Comparative study of virgin olive oil quality from single varieties cultivated in Chile and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12899–12905.
- Garcia, B., Magalhães, J., Fregapane, G., Salvador, M. D., & Paiva-Martins, F. (2012). Potential of selected Portuguese cultivars for the production of high quality monovarietal virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), 1070–1082.
- Garrido-delgado, R., Dobao-prieto, M. M., Arce, L., & Valcárcel, M. (2015). Determination of volatile compounds by GC – IMS to assign the quality of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 187, 572–579.
- Genovese, A., Caporaso, N., Villani, V., Paduano, A., & Sacchi, R. (2015). Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food Chemistry*, 181, 284–294.
- Gertz, C., Aladedunye, F., & Matthäus, B. (2014). Oxidation and structural decomposition of fats and oils at elevated temperatures. *European Journal of Lipid Science and Technology*,

116(11), 1457–1466.

- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., Pera, L. La, & Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101(2), 833–837.
- Gómez-Coca, R. B., Moreda, W., & Pérez-Camino, M. C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135(3), 1205–1209.
- Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., & Luque de Castro, M. D. (2011). Oil Content and Fatty Acid Profile of Spanish Cultivars During Olive Fruit Ripening. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1737–1745.
- Gonzalez-Andujar, J. L. (2009). Expert system for pests, diseases and weeds identification in olive crops. *Expert Systems with Applications*, 36(2), 3278–3283.
- Gouveia, J. M. N. B. (1995). *Azeites Virgens do Alto Alentejo. Comportamentos Químico, Tecnológico e Sensorial. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.*
- GPP. (2007). Olivicultura: Diagnóstico sectorial 2007. Em *Gabinete de Planeamento e Políticas* (p. 52). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento rural e das pescas.
- Granados, J. A. (2000). *Enciclopedia del Aceite de Oliva. Historias y leyendas del aceite y la aceituna.* Barcelona: Editorial Planeta.
- Gravetter, F., & Wallnau, L. (2010). *Essentials of Statistics for the Behavioral Sciences.* 8ª Edição, Cengage Learning. pp. 472–477.
- Gribble, G. W. (2004). Amazing Organohalogens. *American Scientist*, 92(4), 342–347.
- Guardado, J. C., Sánchez, M. E., & Hernández, G. Á. (2006). *Química Organica.* México.
- Guimet, F., Boqué, R., & Ferré, J. (2004). Cluster analysis applied to the exploratory analysis of commercial Spanish olive oils by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6673–6679.
- Gunstone, F. D. (2011). *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses.* 2ª Edição, England: Blackwell Publishing.
- Gutierrez, A. F., & Carretero, A. S. (2009). *Aceite de Oliva Virgen Extra. Tesoro de Andalucía. Fundación Unicaja. Granada.*
- Hair, J. F., Black, W. C., Babin, B. J., Anderson, R. E., & Tatham, R. L. (2006). *Multivariate Data Analysis.* 6ª Edição, Pearson Prentice Hall.
- Hauke, J., & Kossowski, T. (2011). Comparison of values of pearson's and spearman's correlation coefficients on the same sets of data. *Quaestiones Geographicae*, 30(2), 87–93.
- Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D., & Scrimgeour, K. G. (1996). *Principles of Biochemistry.* 2ª Edição, USA: Prentice Hall.
- Hudson, B. J. F., & Lewis, J. I. (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, 10(1), 47–55.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish.* Roma. Itália: FAO Fisheries Technical

Paper.

- Imami, D., Zhllima, E., Canavari, M., & Merkaj, E. (2013). Segmenting Albanian consumers according to olive oil quality perception and purchasing habits. *Agricultural Economics Review*, 14(1), 97–112.
- Inarejos-Garcia, A. M., Androulaki, A., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Tsimidou, M. Z. (2009). Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. *Food Research International*, 42(2), 279–284.
- ISO 3960:2007. (2007). Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination. 4^a Edição, *Suiça*.
- ISO 660:2009. (2009). Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and acidity. (3^a Edição, *Suiça*.
- Jabeur, H., Zribi, A., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2015). Effect of olive storage conditions on Chemlali olive oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food Chemistry*, 169, 289–296.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273–286.
- Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M. J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., Keys, M. H. (1986). The Diet and 15-Year Death Rate in the Seven Countries Study. *American Journal of Epidemiology*, 124(6), 903–915.
- Kiritsakis, a. K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673–681.
- Kiritsakis, A., & Christie, W. W. (2000). Analysis of Edible Oils. In: J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of Olive Oil - Analysis and properties*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., pp. 287-301
- Kiritsakis, A. K. (1992). *El Aceite de Oliva*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones.
- Kiritsakis, A., & Markakis, P. (1987). *Olive Oil: A review*. In: C. O. Chichester (Ed.), *Advances in Food Research*. San Diego: Academic Press Inc., pp. 453-472.
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., Zarrouk, M., & Fregapane, G. (2010). Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry*, 121(1), 171–177.
- Kyçyk, O., Aguilera, M. P., Gaforio, J. J., Jiménez, A., & Beltrán, G. (2016). Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba. *Journal of the science of food and agriculture*, 96(12), 4143–4150.
- Langfelder, P., Zhang, B., & Horvath, S. (2008). Defining *clusters* from a hierarchical *cluster* tree: The Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics*, Oxford, England, 24(5), 719–720.
- Leitão, F., Potes, M. F., Calado, M. L.; Almeida, F. J. (1986). Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. Obtido 3 de Setembro de 2018, de <http://www.dgadr.gov.pt/mediateca/send/10--diversos/26-descricao-de-22-variedades-de--oliveira-cultivadas-em-portugal>

- León, L., Beltrán, G., Aguilera, M. P., Rallo, L., Barranco, D., & De la Rosa, R. (2011). Oil composition of advanced selections from an olive breeding program. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(7), 870–875.
- Lino, M. M. R. M. de O. (2009). *INE 7001 Introdução e Análise Exploratória de Dados. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Informática e Estatística*. Obtido 20 de Abril de 2018, de http://www.inf.ufsc.br/~marcelo/Caps1_e_2.pdf
- López-Escudero, F. J., & Mercado-Blanco, J. (2011). Verticillium wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, 344(1), 1–50.
- López-López, A., Sanchez, A. H., Córtez-Delgado, A., Castro, A., & Montañó, A. (2018). Relating sensory analysis with SPME-GC-MS data for Spanish-style green table olive aroma profiling. *LWT*, 89, 725-734. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 725–734.
- Lucas, L., Russell, A., & Keast, R. (2011). Molecular Mechanisms of Inflammation. Anti-Inflammatory Benefits of Virgin Olive Oil and the Phenolic Compound Oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design*, 17(8), 754–768.
- Manai-djebali, H., Oueslati, I., Martínez-cañas, M. A., Zarrouk, M., & Sánchez-casas, J. (2018). Improvement of the Sterol and Triacylglycerol Compositions of Chemlali Virgin Olive Oils through Controlled Crossing with Mediterranean Cultivars., *Journal of Oleo Science*, 67(4), 379-388.
- Manai, H., Mahjoub-Haddada, F., Oueslati, I., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2008). Characterization of monovarietal virgin olive oils from six crossing varieties. *Scientia Horticulturae*, 115(3), 252–260.
- Manso, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J. L., & González, A. G. (2014). A multiple hollow fibre liquid-phase microextraction method for the determination of halogenated solvent residues in olive oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(5), 1567–1571.
- Martínez-Pineda, M., Ferrer-Mairal, A., Vercet, A., & Yagüe, C. (2011). Physicochemical characterization of changes in different vegetable oils (olive and sunflower) under several frying conditions. *CyTA - Journal of Food*, 9(4), 301–306.
- 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(1), 406–414.
- Matos, L. C. S. A. F. (2003). *Avaliação química de azeites varietais das cultivares Cobrançosa, Madural e Verdeal Transmontana com diferentes índices de maturação*. Tese. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Mello, L. D., & Pinheiro, M. F. (2012). Aspectos físico químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alimentos e Nutrição*, 23(4), 537–548. Obtido 19 de Agosto, de <http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/1417>
- Méndez, A. I., & Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18(5), 521–529.
- Méndez, M. V. R., De la Rosa, I. P., Márquez, A. J., & Ojeda, M. U. (2005). Elimination of pesticides in olive oil by refining using bleaching and deodorization. *Food Additives and Contaminants*, 22(1), 23–30.

- Miyashita, K., & Takagi, T. (1986). Study on the Oxidative Rate and Prooxidant Activity of Free Fatty Acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 63(10), 1380–1384.
- Mooi, E., & Sarstedt, M. (2011). *A Concise Guide to Market Research: The Process, Data, and Methods Using IBM SPSS Statistics*. 1ª Edição, Springer.
- Morales, M. T., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2013). Chromatographic methodologies: compounds for olive oil odor issues. In: R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. 2ª Edição, New York: Springer, pp. 261-309.
- Morales, M. T., Luna, G., & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293–301.
- Moyano, M. J., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2010). The Color of Olive Oils : The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis The Color of Olive Oils : The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of, 9(APRIL), 278–291.
- Navarra, G., Cannas, M., D'Amico, M., Giacomazza, D., Militello, V., Vaccaro, L., & Leone, M. (2011). Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence. *Food Chemistry*, 126(3), 1226–1231.
- Navarro, C. & Parra, A. (2008). "Plantación". In: Barranco, D., Fernandez-Escobar, R. & Rallo, L. (Eds.), *El cultivo del olivo*. 6ª Edição, Madrid: Mundi-Prensa, pp. 189-238.
- Nelson, L., & Cox, M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4ª Edição, EUA: W. H. Freeman and Company.
- Neto, P. V. Estatística Descritiva: Conceitos Básicos- Unieducacional (2004). São Paulo. Obtido 4 de Setembro de 2018, de http://uni.educacional.com.br/up/59960001/3103751/Apos_Est_I_Fev04_C1.pdf
- Noorali, M., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2014). Sterol and fatty acid compositions of olive oil as an indicator of cultivar and growing area. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(9), 1571–1581.
- Ostlund, R. E. (2002). Phytosterols in Human Nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 533–549.
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., & Spiegelhalder, B. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils : the concentration and antioxidant potential of total phenols , simple phenols , secoiridoids , lignans and squalene. *Food chemycal toxicology*, 38, 647–659.
- Paranhos, R., Figueiredo Filho, D. B., Rocha, E. C. da, Silva Júnior, J. A. Da, Neves, J. A. B., & Santos, M. L. W. D. (2014). Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson: o Retorno. *Leviathan (São Paulo)*, (8), 66.
- Pereira, Z. L., & Requeijo, J. G. (2012). *Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos*. 2ª Edição. (FFCT - Fundação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa).
- Peres, M. F., Henriques, L. R., Simões-Lopes, P., Pinheiro-Alves, M. C. (2009). Azeites da Galega Vulgar – Efeito do loteamento e do armazenamento. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 13, 186–191.

- Pérez-Camino, M. D. C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., & Moreda, W. (2008). Alkyl Esters of Fatty Acids a Useful Tool to Detect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 6740–6744.
- Peri, C. (2014). *The extra-virgin olive oil handbook*. 1ª Edição, Oxford, Reino Unido. Wiley Blackwell.
- PerkinElmer. (2014). *Olive Oil Reference Book*. Obtido 21 de Agosto de 2018, de http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/APP_Olive_Oil_Reference_Book.pdf
- Pine, H. S. (1994). *Organska Kemija. Skolska Knjiga*. Zagreb, 933.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in Food: Practical Applications*. 1ª Edição, Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited.
- Procida, G., Giomo, A., Cichelli, A., & Conte, L. S. (2005). Study of volatile compounds of defective virgin olive oils and sensory evaluation: A chemometric approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(13), 2175–2183.
- Regulamento (CE) N.º 1234/2007 do Conselho de 22 de Outubro de 2007. (2007). que estabelece uma organização dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas. *Jornal Oficial da União Europeia*, 299, 1–149.
- Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006. (2006). relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L93, 12–25.
- Regulamento (CE) N.º 708/2005 da Comissão de 10 de Maio de 2005. (2005). que altera determinados elementos do caderno de especificações e obrigações de uma denominação de Origem inscrita no anexo do Regulamento (CE) N.º 1107/96 (Azeites do Norte Alentejano) (DOP). *Jornal Oficial da União Europeia*, L119, 3–7.
- Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 da Comissão de 11 de Julho de 1991. (1991). relativo às características do azeite e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, L248, 1–128.
- Regulamento (UE) N.º 299/2013 da Comissão de 26 de Março de 2013. (2013). que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L90, 52–70.
- Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemists' Society*, 78(9), 881–888.
- Rencher, A. C. (2005). *Methods of Multivariate Analysis*. 2ª Edição, IIE Transactions (Vol. 37). Taylor & Francis.
- Řezanka, T., & Mareš, P. (1991). Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 542, 145–159.
- Rios, H. C. S., Pereira, I. R. O., & Abreu, E. S. (2013). Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. *Revista Ciência & Saúde*, 6(2), 118–126.
- Romero, I., García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Morales, M. T. (2015). Validation of SPME-

- GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta*, 134, 394–401.
- Salas, J. J. (2004). Characterization of Alcohol Acyltransferase from Olive Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3155–3158.
- Sánchez-Hernández, M. E., Dávila, A. R., Pérez-De-Algaba, A., Blanco- López, M. A., & Trapero-Casas, A. (1998). Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 347–357.
- Sánchez, J. L., Carretero, A. S., & Gutiérrez, A. F. (2001). *Composición del aceite de oliva*. In: Omega 3, F., Puleva, I. (Eds.), *Aceite de Oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*, Granada, (pp. 195–224).
- Saraçli, S., Doğan, N., & Doğan, I. (2013). Comparison of hierarchical *cluster* analysis methods by cophenetic correlation. *Journal of Inequalities and Applications*, 2013, 1–8.
- Šarolić, M., Gugić, M., Marijanović, Z., & Šuste, M. (2014). Virgin olive oil and nutrition. *Food in health and disease, scientific-professional journal of nutrition and dietetics*, 3(1), 38–43.
- Sellke, T., Bayarri, M. J., & Berger, J. O. (2001). Calibration of p values for testing precise null hypotheses. *American Statistician*, 55(1), 62–71.
- Serrano, L. J. L. (2014). Monitorização ao longo de 12 meses dos teores de peróxidos, aldeídos e clorofila de azeites virgem extra, monovarietais e de mistura, produzidos em Portugal e armazenados em 4 diferentes condições. *Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública. Instituto Superior de ciências da Saúde Egas Moniz*.
- SIAZ-GPP. (2018). Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de Mesa, Gabinete de Planeamento e Políticas. Obtido 20 de Julho de 2018, de <http://www.gpp.pt/index.php/estatisticas-e-analises/siaz-sistema-informacao-sobre-azeite-e-azeitona-de-mesa>
- Simões-Lopes, P., Peres, M. F., Pinheiro Alves, M. C., & Cordeiro, A. (2009). Composição esteróica e em ácidos gordos de azeites monovarietais provenientes das regiões de Elvas , Castelo Branco e Santarém. *Actas Portuguesas de Horticultura. III Simpósio Nacional de Olivicultura*, 13, 203–208.
- Statsoft, Inc. Tulsa, O. S. (2013). Electronic Statistics Textbook. Obtido 1 de Fevereiro de 2018 de <http://www.statsoft.com/Textbook>
- Taurino, A., Capone, S., Distante, C., Epifani, M., Rella, R., & Siciliano, P. (2002). Recognition of olive oils by means of an integrated sol – gel SnO 2 Electronic Nose. *Thin Solid Films*, 418, 59–65.
- Tena, N., Aparicio, R., & García-González, D. L. (2017). Virgin olive oil stability study by mesh cell-FTIR spectroscopy. *Talanta*, 167, 453–461.
- Tunstall-Pedoe, H., Kuulasmaa, K., Amouyel, P., Arveiler, D., Rajakangas, A. M., & Pajak, A. (1994). Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*, 90(1), 583–612.
- Van Ruth, S. M., Grossmann, I., Geary, M., & Delahunty, C. M. (2001). Interactions between artificial saliva and 20 aroma compounds in water and oil model systems. *Journal of*

agricultural and food chemistry, 49(5), 2409–2413.

- Van Ruth, S. M., & Roozen, J. P. (2000). Aroma compounds of oxidised sunflower oil and its oil-in-water emulsion: Volatility and release under mouth conditions. *European Food Research and Technology*, 210(4), 258–262.
- Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 661–676.
- Vichi, S., Guadayol, J. M., Caixach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2007). Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma. *Food Chemistry*, 105(3), 1171–1178.
- Visioli, F., Poli, A., & Galli, C. (2001). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65–75.
- Ward, J. J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236–244.
- Yorulmaz, H. O., & Konuskan, D. B. (2017). Antioxidant activity, sterol and fatty acid compositions of Turkish olive oils as an indicator of variety and ripening degree. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4067–4077.
- Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (2016). Beginnings of Fruit Growing in the Old World. *American Association for the Advancement of Science*, 187(4174), 319–327.

Anexo I – Métodos para a determinação dos parâmetros físico químicos

I.1 Determinação da Acidez

A acidez foi determinada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Para cada ensaio foi utilizada aproximadamente a toma de 10 g de azeite, que foi dissolvido em um erlenmeyer contendo 90 mL de uma solução (1:1) etanol/éter etílico, previamente neutralizada. Posteriormente fez-se a titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína até a mudança de cor amarelada para rosa ténue. A acidez expressa em percentagem de ácido oleico livre, foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$Acidez (\%) = \frac{Vh \times Ch \times M}{10 \times m} \quad \text{equação (I.1)}$$

Onde,

Vh – volume de hidróxido de sódio gasto na titulação mL;

Ch – concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro;

Mo – 282 g/mol, massa molar do ácido oleico;

m – massa da amostra em grama

I.2 Determinação do Índice de Peróxidos

A determinação do índice de peróxidos foi executada de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. A cada ensaio foi pesado a toma de, aproximadamente, 2 g de azeite e em seguida dissolveu-se em 15 mL de ácido acético, previamente tornado isento de oxigénio, através de uma corrente de gás inerte puro e seco, e 10 mL de clorofórmico, previamente isento de oxigénio, juntamente com 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Depois de agitar por um minuto, tapou-se o erlenmeyer, deixando-o armazenado durante cinco minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Por fim, acrescentou-se 75 mL de água destilada e solução de amido (1 g/100 mL) como indicador, titulando-se o iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01N, tendo-se realizado um ensaio em branco. Os valores de índice de peróxidos

expressos em miliequivalentes de oxigénio ativo por kg de azeite foram calculados de acordo com a equação:

$$\text{Índice de Peróxido mEq.} \left(\frac{\text{O}_2}{\text{Kg}} \right) = \frac{Vt \times N \times 1000}{m} \quad \text{equação (I.2)}$$

Onde:

Vt – 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 gramas.

I.3 Espectrofotometria no Ultravioleta

A análise de absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Para medir absorvâncias de azeite a 268 nm pesou-se aproximadamente 0,25 g de amostra e a 232 nm pesou-se 0,025 g num balão aferido de 25 mL e dissolveu-se em 10 mL de iso-octano, ou o suficiente para atingir o nível do traço de aferição, determinando-se em seguida, em cuvete de quartzo de percurso ótico de 1 cm, o coeficiente de extinção da solução nos comprimentos de onda prescritos em relação ao iso-octano no seu estado puro. As leituras de absorvância foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo UNICAM 500 (figura I.1). Os valores das absorvâncias foram expressos em termos de extinção específica, designada por ΔK (coeficiente de extinção). Os coeficientes de extinção a 232 nm, 268 nm e ΔK foram calculados da seguinte forma:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s} \quad \text{equação (I.3)}$$

$$\Delta K = \left| K_{268} - \frac{K_{264} + K_{272}}{2} \right| \quad \text{equação (I.4)}$$

Onde:

$K\lambda$ – extinção específica para o respetivo comprimento de onda;

$E\lambda, K_{264}, K_{268}, K_{272}$ – absorvância para o respetivo comprimento de onda;

c – concentração do azeite em g/100 mL;

s – percurso ótico na célula de quartzo (1 cm).



Figura I.1 - Espectrofotómetro onde se efetuaram as leituras de absorvâncias

I.4 Determinação dos estigmastadienos

A determinação dos estigmastadienos foi realizada de acordo com o anexo XVII do já referido Regulamento. Este método é utilizado para detetar a presença de óleos vegetais refinados (azeite, óleo de bagaço de azeitona, óleo de girassol, entre outros) em azeites virgens.

Este método consiste no isolamento da matéria insaponificável, seguido da separação da fração que contém os hidrocarbonetos esteróides por cromatografia em coluna de silicagel e posterior análise em cromatografia gasosa.

A técnica iniciou-se com a preparação da matéria insaponificável. Para tal pesou-se 20g de amostra para um balão de 250 mL ao qual foi adicionado 1 mL de solução padrão de colest-3,5-dieno e 75 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (10 mL de água para 50 g de hidróxido de potássio num balão de 500 mL, agitou-se e perpez-se com etanol).

De seguida colocou-se o balão a aquecer até ebulição ligeira. Adicionou-se 100 mL de água (para facilitar a separação de fases) e colocou-se a solução numa ampola de decantação, seguidamente adicionou-se 100 mL de hexano, agitou-se vigorosamente durante 30 segundos. Deixou-se em repouso para separação das fases e recolheu-se a fase superior. Posteriormente lavou-se novamente a fase inferior com hexano (ao final de duas lavagens só foi aproveitada a fase superior).

A fase recolhida anteriormente foi novamente lavada com uma mistura de etanol/água (1:1) três vezes, só a fase superior foi aproveitada e tratada com sulfato de sódio anidro e evaporou-se num evaporador rotativo.

Em seguida, procedeu-se à separação da fração que contém os hidrocarbonetos esteróides, colocando-se o resíduo obtido anteriormente numa coluna, que foi anteriormente preparada com 15 g de silicagel e hexano, iniciou-se a eluição cromatográfica com hexano, em que foram desprezados os primeiros 25-30 mL de eluído e recolheu-se num balão de 100 mL os 40 mL seguintes, esta segunda fase contém os hidrocarbonetos esteróides (Figura I.2).

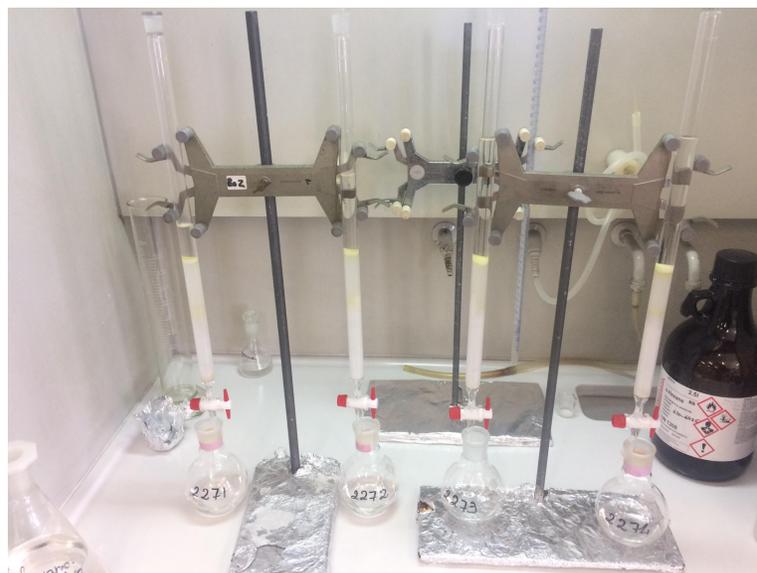


Figura I.2 - Separação em camada de silicagel dos hidrocarbonetos esteróides

Evaporou-se novamente num evaporador até à secura e dissolveu-se o resíduo em 0,2 mL de hexano. Por fim, analisou-se a amostra por meio de um cromatógrafo gasoso (GC) Hewlett Packard, modelo 5890 com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 μ L, injetor com detetor de ionização por chama (FID) e uma coluna de silicagel fundida com fase estacionária SE-52 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) com as dimensões de 25m \times 0,32 mm \times 0,25 μ m. O gás de arraste utilizado foi o hélio com uma pressão de 120 kPa. As temperaturas do detetor e injetor são respectivamente de 320 $^{\circ}$ C e 300 $^{\circ}$ C, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 μ L.

Em relação à identificação dos picos, aos 19 minutos surge o padrão colestá-3,5-dieno e o estigmasta-3,5-dieno surge depois. Para a análise quantitativa do teor de estigmastadienos recorreu-se à equação I.5.

$$mg/Kg \text{ de estigmastadienos} = \frac{A_s + M_c}{A_c + M_0} \quad \text{equação (I.5)}$$

Em que:

A_s = área do pico relativo ao estigmastadieno.

A_c = área do pico relativo ao padrão interno (colestadieno).

M_c = massa de padrão adicionada (mg).

M_0 = massa da amostra (g)

I.5 Determinação dos ácidos gordos e seus ésteres metílicos

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o descrito no anexo XA do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Os ácidos gordos assim como os seus ésteres metílicos, foram avaliados recorrendo à transesterificação direta à temperatura ambiente, com hidróxido de potássio metanólico e extração com n-heptano (Figura I.3 e I.4). A toma de 7 gotas de amostra foi dissolvida em 2 mL de n-heptano e 200 μ L de hidróxido de potássio preparado em metanol.

O perfil em ácidos gordos foi determinado por cromatógrafo gasoso (GC) Agilent, modelo 7890A, com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 μ L, injetor com detetor de ionização por chama (FID), amostrador automático modelo Agilent G2614A e uma coluna de silicagel fundida com fase estacionária SPTM-2380 (90% biscianopropil e 10% cianopropilfenilsiloxano) com as dimensões de 60m \times 0,25 mm \times 0,2 μ m. O gás de arraste utilizado foi o hélio com uma pressão de 179 kPa. As temperaturas do detetor e injetor é igualmente de 250 °C, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 μ L. Os resultados são expressos em percentagem de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico e eluído entre os ésteres mirístico, lignocérico e metílico.

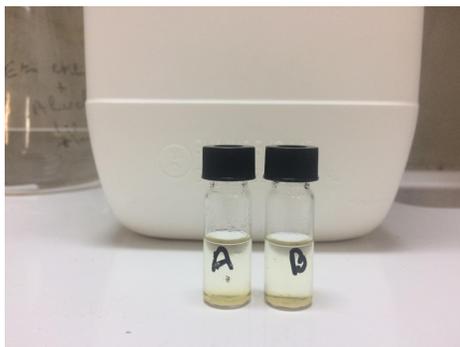


Figura I.3 - Amostras em repouso para a reação de transesterificação



Figura I.4 - Amostra após a reação da transesterificação

I.6 Determinação dos ésteres etílicos dos ácidos gordos

A determinação de ésteres etílicos de ácidos gordos foi determinada de acordo com o descrito no anexo XX do documento anteriormente referido. O método baseia-se na adição à amostra de padrões internos adequados com posterior fracionamento por cromatografia em coluna de silicagel hidratada, seguidamente é feita a recuperação da fase eluída e por fim é realizada a análise em cromatografia gasosa. Esta análise possui a finalidade de distinguir azeites de óleos de bagaço de azeitona e de determinar a qualidade dos azeites virgens extra, permitindo a deteção de

misturas fraudulentas destes com azeites de qualidade inferior quer sejam virgens, lampantes ou desodorizados.

Numa balança analítica, pesou-se 0,500g de amostra à qual se adicionou 250 μL de uma solução padrão de ésteres (heptadecanoato de metilo). A amostra foi colocada numa coluna preparada com 15 g de silicagel em n-hexano, onde se iniciou a eluição cromatográfica através da passagem de 220 mL de uma mistura de n-hexano/éter etílico (99:1), a passagem deve ocorrer com um caudal de 15 gotas por cada 10 segundos.

Após esta etapa, a fração resultante foi a evaporar num evaporador rotativo, até à eliminação total do solvente (Figura I.5). Em seguida, adicionou-se 2 mL de heptano.

A determinação de ésteres etílicos foi então efetuada através da injeção de 1 μL da toma no cromatógrafo gasoso Hewlett Packard, modelo 5890 com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 μL , injetor com detetor de ionização por chama (FID) e uma coluna de silicagel fundida com fase estacionária SGL-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) com as dimensões de 15 m \times 0,32 mm \times 0,1 μm . O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura do detetor é de 350 $^{\circ}\text{C}$, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 μL . A injeção deve possuir as condições ideais para a análise, efetuou-se o registo até a eluição completa. Os picos foram identificados com base no tempo de retenção.



Figura I.5 - Amostra no evaporador rotativo até à secura do solvente

Para a análise quantitativa dos ésteres etílicos determinou-se as áreas dos picos correspondentes ao padrão heptadecanoato de metilo e aos ésteres etílicos dos ácidos gordos C16 e C18. O teor de cada éster alquílico é expresso em mg/kg de gordura com recurso à equação I.6.

$$\text{Ester mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_p \times m} \quad \text{equação (I.6)}$$

Onde:

A_x = área do pico correspondente a um determinado éster C16 ou C18.

A_p = área do pico correspondente ao padrão interno (heptadecanoato de metilo).

m_s = massa de padrão interno (heptadecanoato de metilo) adicionado (mg).

m = massa da toma de amostra para a determinação (g).

I.7 Determinação dos esteróis, eritrodiol e uvaol

A determinação dos esteróis foi realizada por cromatografia gasosa e detecção por ionização de chama (GC/FID), de acordo com o descrito no anexo V do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. Após a adição num balão de fundo plano de 500 μ L de α -colestanol 0,2% (m/v) em clorofórmio como padrão interno, evaporou-se na corrente de azoto até à secura e em seguida pesou-se rigorosamente 500 mg de amostra para o balão, procedeu-se à saponificação da amostra com 50 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio (130 g de hidróxido de potássio e 200 mL de água destilada, perfaz-se o balão até 1 L com etanol) e foi ao lume até uma ligeira ebulição, até que produza a saponificação (a solução fica límpida).

Após este processo adicionou-se 50 mL de água destilada e transferiu-se o conteúdo do balão para uma ampola de decantação. Juntou-se cerca de 75 mL de éter etílico, agitou-se energeticamente durante 30 segundos e deixou-se repousar até ocorrer a separação de fases (Figura I.6). Separou-se a fase inferior da superior, recolhendo a superior. Realizaram-se mais duas extrações utilizando 75 mL de éter etílico (se ocorrerem emulsões durante o processo pode juntar-se uma pequena quantidade de etanol).

Os extratos etéreos, ou seja, a parte superior que fora recolhida anteriormente, foi colocada na ampola e lavou-se três vezes com 50 mL de água destilada até obter uma reação neutra. No final foi feita uma filtração com sulfato de sódio anidro de modo a eliminar a água de lavagem, em que o extrato anterior é recolhido.



Figura I.6 - Separação de fases na extração líquido-líquido

A fração resultante foi ao evaporador rotativo a evaporar. De seguida colocou-se a solução de eluição (65 mL de Hexano e 35 mL de éter etílico) na câmara de revelação das placas até uma altura de 1 cm e deixou-se repousar durante 30 minutos para que ocorra o equilíbrio líquido/vapor. Preparou-se uma solução a 5% do extrato insaponificável em acetato de etilo, depositou-se a 2 cm do bordo inferior da placa cromatográfica 0,3 mL desta solução, numa linha contínua, fina e uniforme. Neste alinhamento depositou-se 2-3 μ L da solução de referência, a fim de identificar a banda de esteróis e de diálcoois triterpénicos após a revelação.

Colocou-se a placa na câmara de revelação, tapou-se e deixou-se eluir até que a frente de solvente chegasse a cerca de 1 cm do bordo superior da placa. Retirou-se a placa da câmara, deixando-a sob um exaustor durante alguns momentos. De seguida nebulizou-se a placa uniformemente com a solução 2,7 diclorofluoresceína e deixou-se secar. Delimitou-se com um lápis a banda de esteróis e álcoois triterpénicos, que se alinha com a mancha obtida para a solução de referência quando observada à luz ultravioleta.

O silicagel da zona delimitada foi raspado com uma espátula metálica, colocou-se num cadinho filtrante ao qual adicionou-se 10 mL de acetato de etilo quente e filtrou-se.

Lavou-se o filtrado 3 vezes por meio da adição de 10 mL de éter etílico de cada vez. De seguida evaporou-se o filtrado até um volume de 4-5 mL. Transferiu-se para um vial previamente tarado e levou-se posteriormente à completa secura recorrendo a uma corrente de azoto. De seguida, adicionou-se o reagente de sililação (piridina, hexametildissilazano e trimetilclorossilano) à

fração esteróica e de diálcoois triterpénicos na proporção de 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de esteróis e diálcoois triterpénicos, tapou-se e deixou-se em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Finalmente os esteróis e álcoois triterpénicos foram determinados por cromatógrafo gasoso (GC) Hewlett Packard, modelo 5890 com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 μL , injetor com detetor por ionização de chama (FID) e uma coluna de silicagel fundida com fase estacionária SE-52 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) com as dimensões de 25 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi o hélio. As temperaturas do detetor e injetor são igualmente de 280 $^{\circ}\text{C}$, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 μL . Com uma microseringa colheu-se 1 μL da amostra e introduziu-se a agulha através da membrana de injeção e injetou-se rapidamente. Procedeu-se ao registo até a eluição completa dos esteróis presentes. Identificaram-se os picos com base nos tempos de retenção sendo os esteróis e os diálcoois triterpénicos eluídos pela seguinte ordem: colesterol, brassicasterol, 24-metilenocolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, $\Delta 7$ -campesterol, Δ -5,23-estimastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol, Δ -5,24- estigmasterol, $\Delta 7$ -estigmasterol, $\Delta 7$ -avenasterol, eritrodol e uvaol.

Para a avaliação quantitativa, procedeu-se com o integrador ao cálculo da área dos picos do α -colestanol e dos outros esteróis.

O teor de cada esterois em mg/100g de matéria gorda calcula-se de acordo com a equação 1.7.

$$\text{Esterol } x = \frac{A_x \times m_a \times 1000}{A_a \times m} \quad \text{equação (1.7)}$$

Onde:

A_e = área do pico correspondente do esterois x.

A_a = área do pico correspondente ao padrão interno alfa-colestanol.

m_a = massa de padrão interno (alfa-colestanol) adicionado (mg).

m = massa da toma de amostra para a determinação (g).

Após a determinação do teor de cada esterois e a soma de todos, calculou-se através da equação 1.8 a percentagem de cada um dos esteróis, tendo em conta a relação entre a área do respetivo pico e a soma das áreas dos picos de todos os esteróis.

$$\% \text{ do Esterois } = \frac{A_e}{\sum A} \times 100 \quad \text{equação (1.8)}$$

Em que:

A_e = área do pico correspondente do esterois x.

A = soma da área de todos os esteróis.

A percentagem de eritrodiol presente no azeite foi determinada de acordo com a equação I.9

$$\% \text{ de eritrodiol} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteróis}}} \times 100 \quad \text{equação (I.9)}$$

Onde:

A1= área do pico correspondente ao eritrodiol.

A2= área do pico correspondente ao uvaol.

$\sum A_{\text{esteróis}}$ = soma das áreas correspondentes aos esteróis.

I.8 Determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 (Diferença entre o teor obtido por HPLC e o teor teórico)

Este método realizou-se de acordo com o anexo XVIII do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, tendo como objetivo determinar a composição de triacilgliceróis (TAG) em azeites, com base nas diferenças entre os resultados analíticos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o teor teórico, calculado a partir da composição de ácidos gordos. O método é aplicável à pesquisa de pequenas quantidades de óleos de semente (ricos em ácido linoleico) em todas as categorias de azeite.

O método de cálculo do teor de triacilgliceróis com número de átomos de carbono equivalente a 42 (NCE42) e da diferença entre este e o valor obtido por HPLC assenta essencialmente na coordenação de dados analíticos obtidos por outros métodos. Podem distinguir-se três etapas: determinação da composição de ácidos gordos por cromatografia gás-líquido em coluna capilar, cálculo da composição teórica de triacilgliceróis com NCE42 e determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 por HPLC.

Como referido anteriormente a determinação dos ácidos gordos é determinada através do anexo XA e XB do Regulamento anteriormente referido.

Para a determinação do teor de triacilgliceróis com NCE42 por HPLC, pesou-se num balão volumétrico de 10 mL, 0,5 g da amostra, este deve ser aferido com acetona. O sistema cromatográfico (HPLC) deve ser preparado procedendo inicialmente à purga total do sistema por bombagem do solvente de eluição (mistura de acetonitrilo 52,5% e acetona 47,5%). Injetou-se 10 μ L de amostra preparada anteriormente e iniciou-se a eluição durante 50 minutos. De seguida procedeu-se ao cálculo e expressão de resultados de acordo com a equação I.10, utilizando o método da normalização interna, considerando a soma das áreas dos picos correspondentes aos triacilgliceróis com NCE42.

$$\% \text{ de triacilglicerol} = \frac{\text{Área do pico} \times 100}{\text{Soma das áreas dos picos}} \quad \text{equação (I.10)}$$

I.9 Determinação das Ceras

A determinação de ceras foi realizada de acordo com o descrito no anexo IV do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações. As ceras são separadas de acordo com o número de átomos de carbono. O método é usado para distinguir azeites de óleos de bagaço de azeitona e para determinar a qualidade dos azeites virgens extra permitindo a deteção de misturas fraudulentas com azeites de qualidade inferior quer sejam virgens, lampantes ou desodorizados.

O método utilizado baseou-se na adição à amostra de padrões internos adequados, seguido de fracionamento por cromatografia em coluna de silicagel hidratada com posterior recuperação da fração eluída e análise em cromatografia gasosa com coluna capilar.

Numa balança analítica, pesou-se 0,500g de amostra à qual se adicionou 100 µg de uma solução padrão de ceras (araquidato de laurilo), que varia em função do teor de ceras previsível. A amostra foi colocada com o auxílio de 2 porções de 2 mL de hexano numa coluna preparada com 15 g de silicagel, fez-se passar 30 mL de hexano e assim que o solvente atingiu 1 mm acima da camada de silicagel iniciou-se a eluição cromatográfica através da passagem de mais 70 mL de hexano, sendo esta primeira fração descartada, em seguida fez-se passar 180 mL de uma mistura de n-hexano/éter etílico (99:1), a passagem deve ocorrer com um caudal de 15 gotas por cada 10 segundos, constituindo desta forma a fração recolhida que contém as ceras.

Após esta etapa, a fração resultante foi a evaporar num evaporador rotativo, até à eliminação total do solvente. Em seguida, adicionou-se 2 mL de heptano.

A determinação de ceras foi então efetuada através da injeção de 1 µL da toma no cromatógrafo gasoso Hewlett Packard, modelo 5890 com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 µL, injetor com detetor por ionização de chama (FID) e uma coluna de silicagel fundida com fase estacionária SGL-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) com as dimensões de 15 m × 0,32 mm × 0,1 µm. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura do detetor é de 350 °C, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 µL. A injeção deve possuir as condições ideais para a análise, efetuou-se o registo até a eluição completa. Identificaram-se os picos com base no tempo de retenção.

Para a análise quantitativa das ceras determinou-se as áreas dos picos correspondentes ao padrão araquidato de laurilo e aos ésteres alifáticos do C40 e C46, com o auxílio do integrador. O teor total de ceras foi expresso em mg/kg através do somatório das várias ceras recorrendo à equação I.11.

$$Ceras\ mg/kg = \frac{A_{es} \times m_{at} \times 1000}{A_t \times m} \quad \text{equação (I.11)}$$

Em que:

Aes= área do pico correspondente a um determinado éster.

Al = área do pico correspondente ao padrão interno (araquidato de laurilo).

m_{ai} = massa de padrão interno (araquidato de laurilo) adicionado (mg).

m = massa da toma de amostra para a determinação (g).

I.10 Determinação do monopalmitato de 2-glicerilo

Este método realizou-se de acordo com o anexo VII do Regulamento (CEE) N° 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações, tendo como objetivo determinar a percentagem de ácido palmítico em posição 2 dos triglicéridos. A técnica consiste numa digestão enzimática específica, que elimina os ácidos gordos na posição 1 e 3, e subsequente análise por cromatografia gasosa com detetor por ionização de chama (GC-FID) de monogliceróis.

Primeiramente preparou-se a amostra que consiste na sua neutralização sempre que a acidez livre for superior a 3%. Pesou-se 50 g de amostra, misturou-se com 200 mL de hexano e colocou-se na ampola de decantação. À ampola juntou-se 100 mL de isopropanol e uma quantidade de hidróxido de potássio a 12%, dependendo da acidez livre do azeite majorada de 5%. Agitou-se energicamente durante 1 minuto, adicionou-se 100 mL de água destilada, agitou-se novamente e deixou-se em repouso.

Após a decantação, foram realizadas sucessivas lavagens à camada superior com 60 mL de solução de isopropanol/água (1:1) até desaparecimento da cor carmim da fenoltaleína.

Evaporou-se a maior parte do solvente no evaporador rotativo, transferiu-se para um balão de 100 mL e levou-se à secura total do solvente sob vácuo.

Introduziu-se 1 g da amostra já preparada num erlenmeyer de 25 mL, dissolveu-se em 10 mL de eluente e deixou-se repousar durante 15 minutos. A amostra foi colocada numa coluna preparada com 25 g de silicagel, fez-se passar 80 mL de eluente, e deixou-se escorrer até que o nível deste desça até cerca de 2 mm acima do nível superior do silicagel para adicionar a amostra. Posteriormente fez-se passar 150 mL de eluente com um caudal de 2 mL/min. Evaporou-se o solvente num evaporador rotativo e com o auxílio de uma corrente de azoto levou-se à completa secura do solvente.

Seguidamente submeteu-se o resíduo seco à hidrólise pela ação da lipase pancreática, colocando num tubo de centrífuga 0,1 g de azeite, adicionou-se 10 mL de solução tampão, 0,5 mL de solução de colato de sódio e 0,2 mL de solução de cloreto de cálcio. Agitou-se bem após cada adição. Tapou-se o tubo com a rolha esmerilada e colocou-se no termóstato a $40 \pm 0,5$ °C. Adicionou-se 20 mg de lipase, agitou-se e colocou-se no termóstato durante 2 minutos. Em seguida retirou-se, agitou-se energicamente durante 1 minuto e deixou-se arrefecer.

Seguidamente foi adicionado 1 mL de éter etílico, tapou-se, agitou-se energicamente e centrifugou-se.

Foram introduzidos 100 μL desta solução num tubo de fundo cónico com uma microseringa e juntou 200 μL de reagente de silanização, tapou-se e deixou-se repousar por 20 minutos. Decorrido esse tempo adicionou-se 1 mL de hexano e por fim injetou-se 1 μL da toma no cromatógrafo gasoso Hewlett Packard, modelo 5890 com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split 1:50 e volume de injeção de 1 μL , com detetor por ionização de chama (FID). O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura do detetor foi de 350 °C, com a relação de Split de 1:50 e um volume de injeção de 1 μL e do injetor é de 68 °C. A injeção deve possuir as condições ideais para a análise, efetuou-se o registo até a eluição completa. Identificaram-se os picos com base no tempo de retenção.

Para o cálculo da percentagem do monopalmitato de glicerilo considera-se a relação da área do respetivo pico e a soma das áreas dos picos de todos os monoglicéridos, utilizando a equação I.12:

$$\% \text{ de monopalmitato de glicerilo} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100 \quad \text{equação (I.12)}$$

Em que:

A_x – Área do pico relativo ao monopalmitato de glicerilo

ΣA – Soma das áreas correspondentes a todos os picos de monoglicéridos

I.11 Determinação da Trilinoleína

O método usado na determinação da composição em triacilgliceróis está descrito no anexo VIII do Regulamento (CEE) N.º 2568/91, posteriormente alterado pelo Regulamento (CE) N.º 702/2007. A determinação do teor de trilinoleína, descrita no anexo VIII, tem como objectivo a separação e a determinação quantitativa do teor de triacilgliceróis de óleos vegetais, em termos do seu peso molecular e grau de insaturação, em função do respectivo número de átomos de carbono. Neste método foi aplicada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A percentagem relativa de cada triacilglicerol foi fornecida pela área do composto no cromatograma.

I.12 Determinação de Solventes halogenados

A determinação dos solventes halogenados foi realizada de acordo com o anexo XI do Regulamento já referido anteriormente. Para a execução da técnica pesou-se 3 g de azeite num frasco, fechou-se hermeticamente e manteve-se à temperatura de 70 °C durante uma hora. Seguidamente recolheu-se com precisão, utilizando uma seringa, um volume de 0,5 mL do espaço de cabeça. Como soluções-padrão utilizou-se azeite sem vestígios de solventes a uma concentração entre 0,05 e 1 mg/kg e em relação com o teor presumido da amostra.

Injetou-se no cromatógrafo gasoso Agilent, modelo 6890N. A temperatura do detetor foi de 250 °C e do injetor foi de 150 °C. A injeção deve possuir as condições ideais para a análise e efetuou-se o registo até a eluição completa.

Para a análise quantitativa dos solventes halogenados estabeleceu-se a relação entre as áreas ou altura dos picos dos cromatogramas da amostra e da solução-padrão que tenha a concentração presumida mais próxima. Caso o desvio seja superior a 10% é necessário fazer uma segunda análise por comparação com uma nova solução-padrão, até que a sua concentração respeite o desvio relativo acima mencionado, sendo os resultados expressos em mg/kg.

Anexo II – Dendogramas (Análise de clusters)

II.1 Variáveis (Físico químicas)

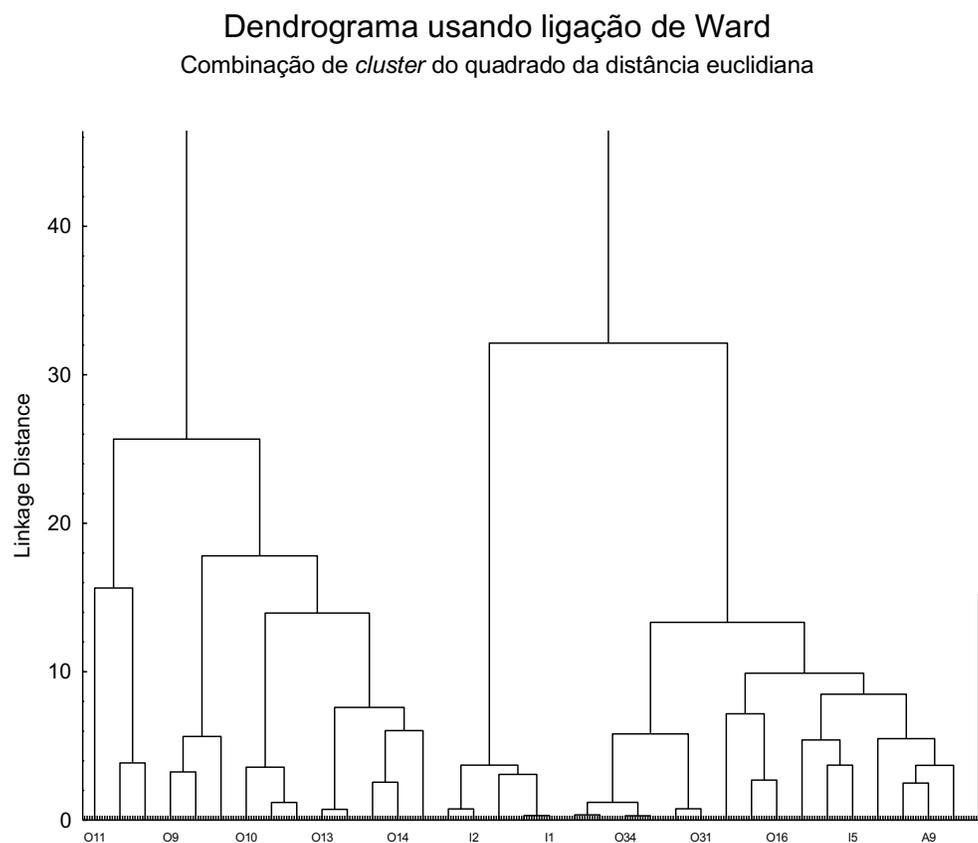


Figura II.1 - Dendrograma com o *cluster* 1 e 2 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

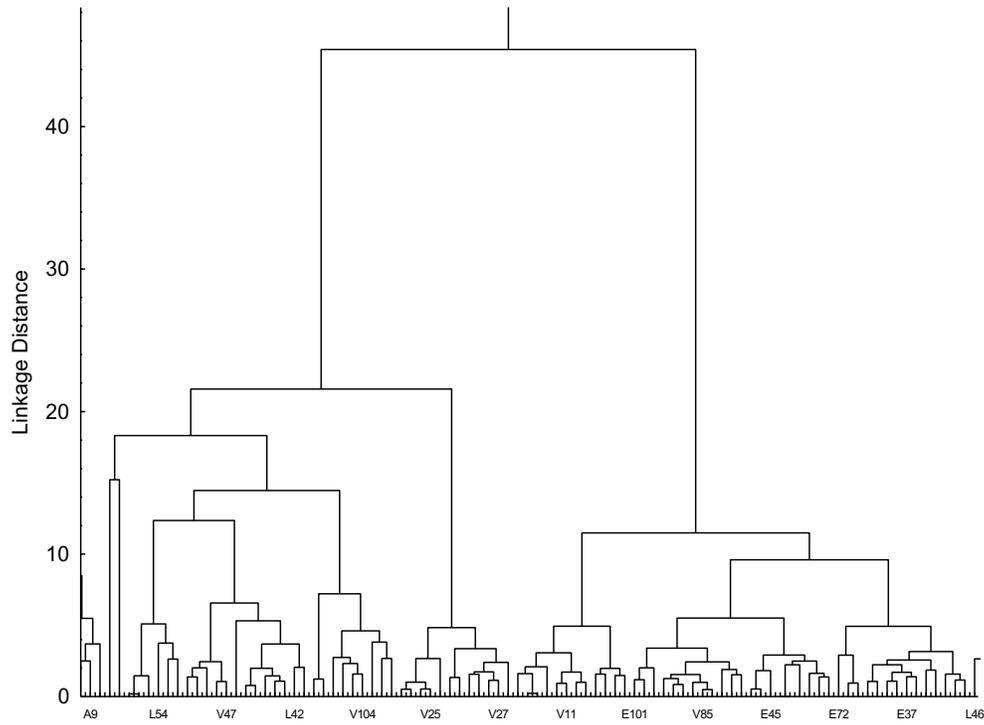


Figura II.2 - Dendrograma com o *cluster* 3 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

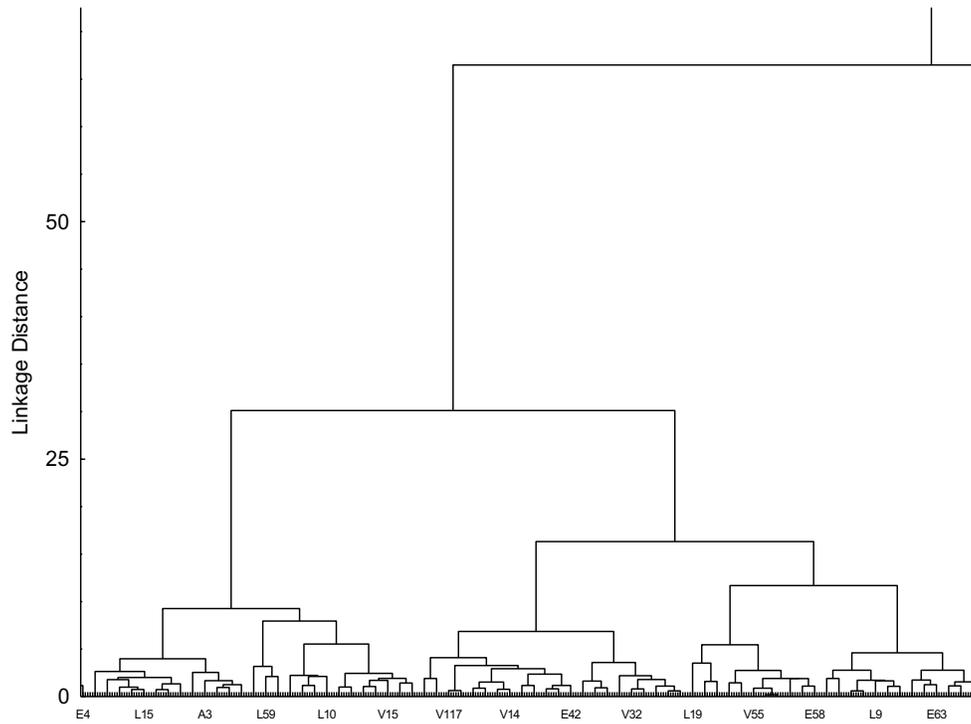


Figura II.3 - Dendrograma com o *cluster* 4 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

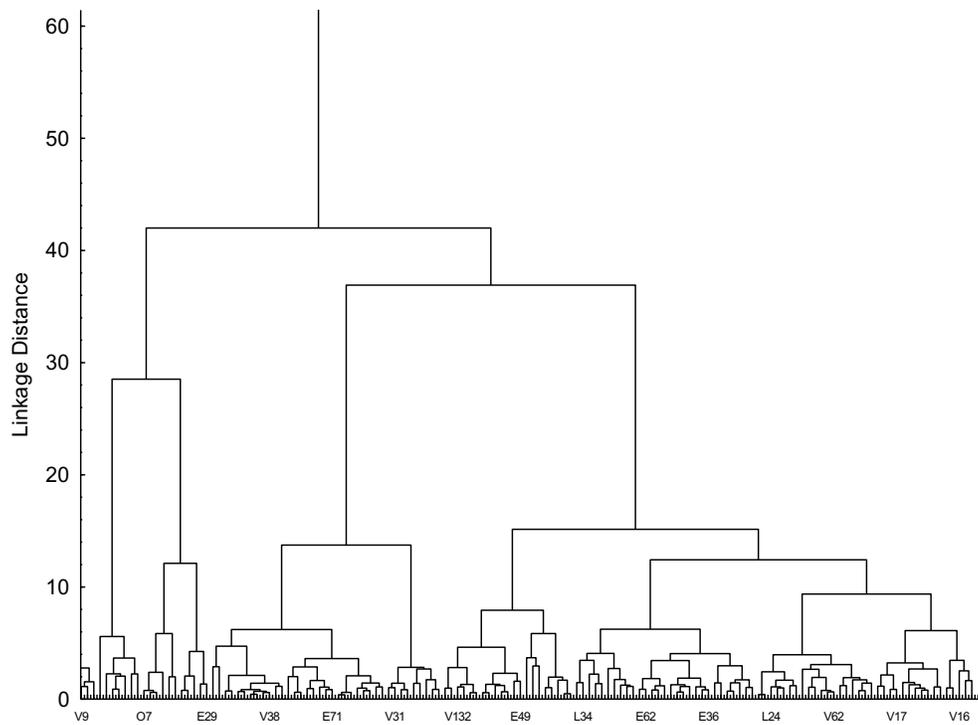


Figura 4 - Dendrograma com o *cluster* 5 das variáveis físico químicas de todas as amostras de azeite

II.2. Variáveis (Sensoriais)

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

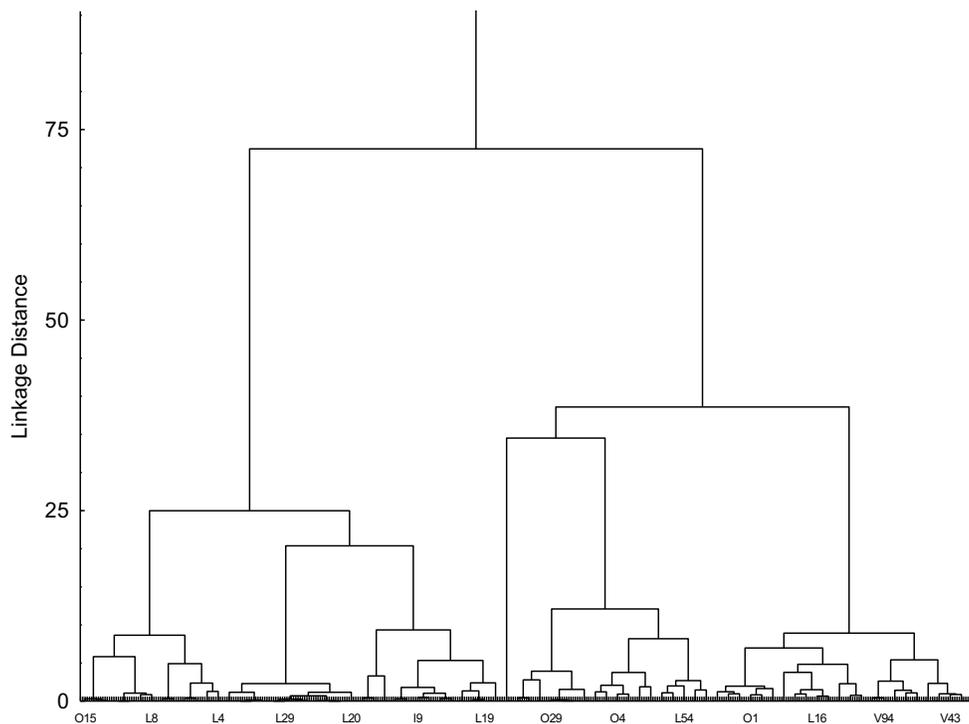


Figura II.5 - Dendrograma com o *cluster* 1 e 2 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

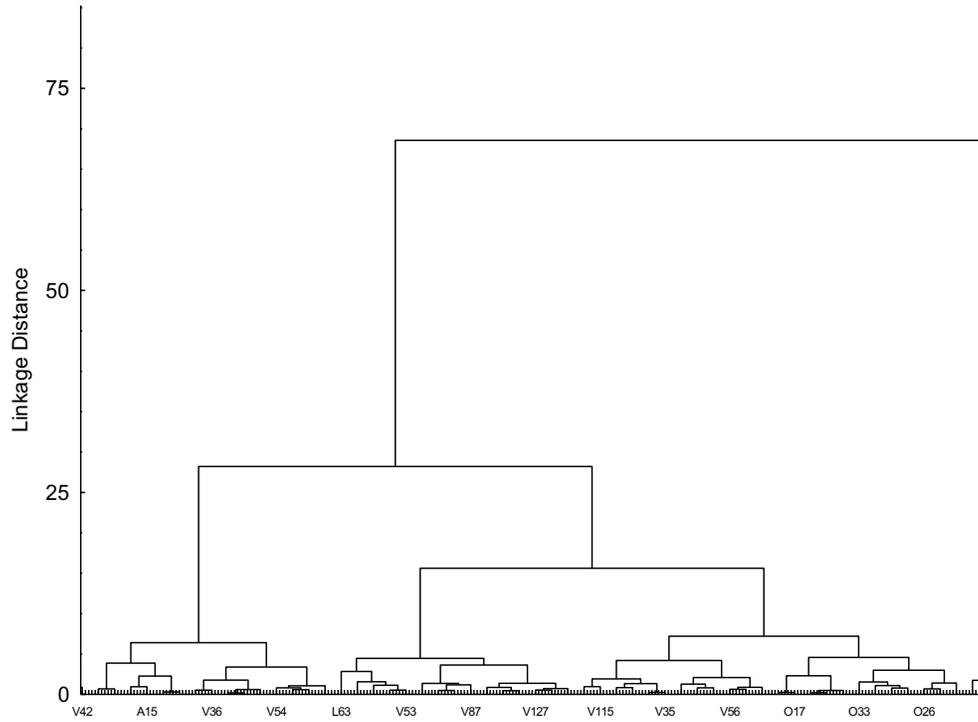


Figura II.6 - Dendrograma com o *cluster* 3 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

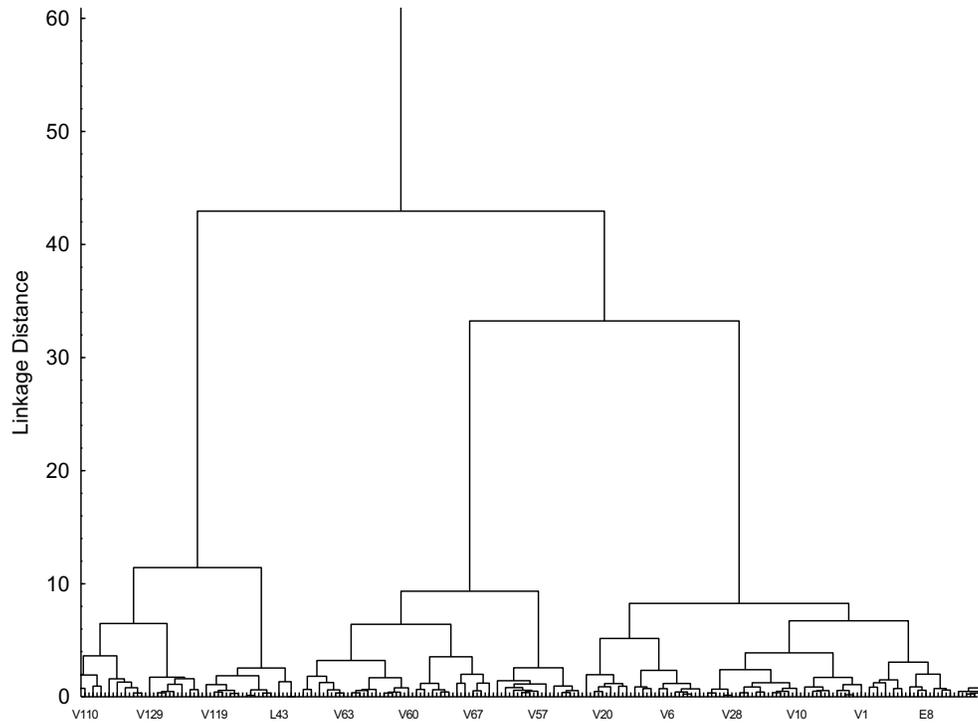


Figura II.7 - Dendrograma com o *cluster* 4 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite

Dendrograma usando ligação de Ward
Combinação de *cluster* do quadrado da distância euclidiana

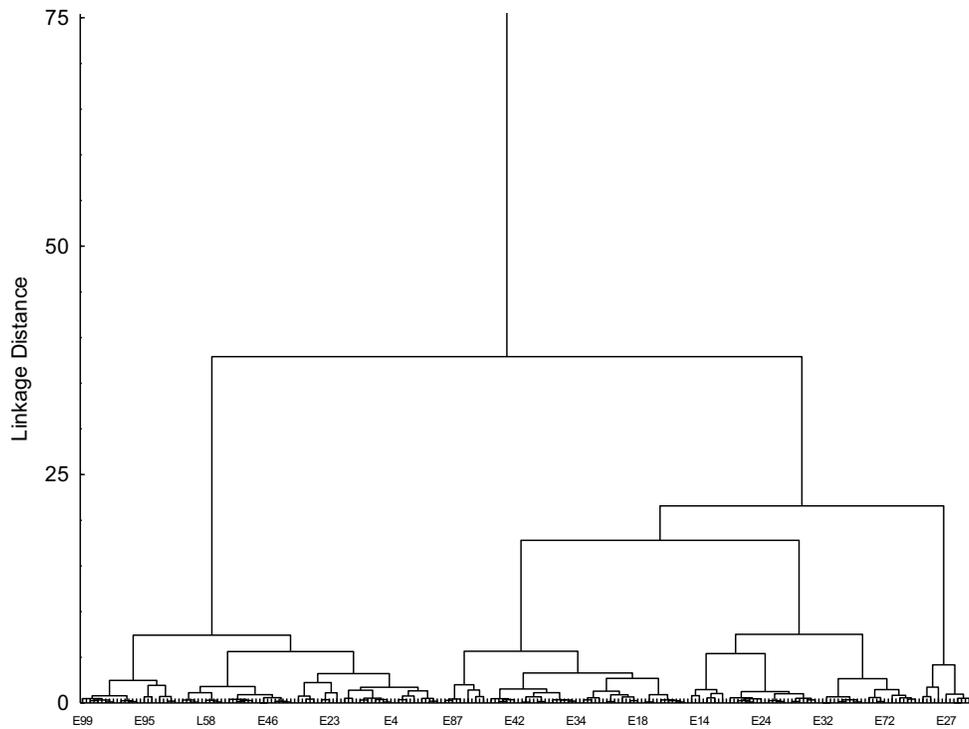


Figura II.8 - Dendrograma com o *cluster* 5 das variáveis sensoriais de todas as amostras de azeite