

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

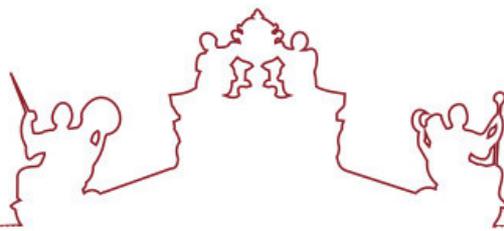
**Espetrometria de massa de razões isotópicas na
determinação da origem geográfica de azeites de Portugal**

Vera Susana Correia Palma

Orientador(es) | Maria João Pires de Bastos Cabrita
Nicásio Tomás Jiménez Morrillo

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

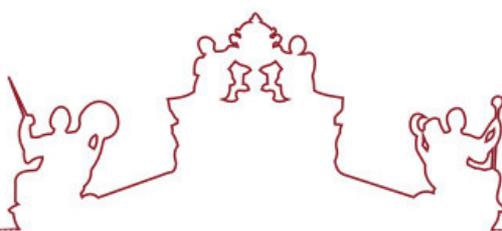
Dissertação

**Espetrometria de massa de razões isotópicas na
determinação da origem geográfica de azeites de Portugal**

Vera Susana Correia Palma

Orientador(es) | Maria João Pires de Bastos Cabrita
Nicásio Tomás Jiménez Morrillo

Évora 2020



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

Presidente | Célia Maria Miguel Antunes (Universidade de Évora)

Vogais | Cristina Maria Barrocas Dias (Universidade de Évora) (Arguente)
Maria João Pires de Bastos Cabrita (Universidade de Évora) (Orientador)

Évora 2020

À minha família

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de várias pessoas e entidades, a quem quero expressar os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores. Ao Dr. Nicasio por tudo o que me ensinou. O seu imenso conhecimento na área e a alegria e boa disposição com que o partilhava, foram a essência do sucesso deste trabalho. O seu ânimo e constante incentivo foram fundamentais para que este trabalho chegasse a bom termo.

À Prof^a Maria João Cabrita por mais uma vez ter acreditado em mim e me ter dado a oportunidade de voltar a trabalhar numa área que tanto gosto. A sua dedicação é uma inspiração para todos.

Ao Laboratório HERCULES pelas facilidades proporcionadas na execução do trabalho laboratorial, em particular na pessoa da Prof^a Cristina Dias, pela forma como me recebeu no laboratório e pela confiança demonstrada.

Ao projeto Por3O – Portuguese Olive Oil Omics or traceability and authenticity, no âmbito do qual este trabalho se realizou.

A todos os meus colegas de mestrado pela alegria e companheirismo ao longo da parte curricular. Tornaram todo o percurso mais fácil.

Aos amigos que fiz no laboratório HERCULES. Quando os nossos colegas vêm de todo o mundo, toda esta experiência se torna muito mais enriquecedora.

E principalmente à minha família. À minha mãe porque foi desde sempre o meu suporte e cujo apoio foi sempre incondicional e ao Dorica pela boa disposição, disponibilidade e por ter sempre um almocinho pronto.

À minha filha por ser a maior alegria que alguém pode ter e pelas constantes manifestações do orgulho que tem em mim. Nas alturas mais difíceis foi a força que me fez continuar.

Ao meu marido, que quando disse que gostava de voltar a estudar foi o primeiro a incentivar, lembrando-me da importância da felicidade em fazermos o que mais gostamos. Sem ele e o seu apoio incondicional, nada disto seria possível.

Espetrometria de massa de razões isotópicas na determinação da origem geográfica de azeites de Portugal

O uso combinado de razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ com técnicas quimiométricas é uma ferramenta poderosa para estabelecer a origem geográfica de Azeites Virgem Extra (AVE). O objetivo deste trabalho foi determinar a correlação entre a composição isotópica e as principais variáveis relacionadas com a localização geográfica. Foram analisadas 38 amostras de AVE de 11 variedades provenientes de diversas localizações em 2 regiões de Portugal (Alentejo e Trás-os-Montes) com um analisador elementar acoplado a um espectrómetro de massa de razões isotópicas. A análise multivariada permitiu distinguir os azeites provenientes de regiões diferentes e quais as variáveis que mais influenciavam essa distribuição. O modelo apresentado mostra que os valores da composição isotópica foram suficientes para prever significativamente ($P < 0,05$) a latitude, longitude, altitude, distância ao oceano, temperatura e precipitação. Este trabalho mostrou que a composição isotópica fornece informação não só relativamente à origem geográfica mas também às condições ambientais.

ABSTRACT

Isotope ratio mass spectrometry for determination of the geographic origin of olive oils from Portugal

The combined use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic ratios with chemometric techniques is a powerful tool to establish the geographical origin of extra virgin olive oils (EVOO). This work aims to establish the correlation between isotopic composition and the main variables related to geographic location. 38 EVOO samples from 11 varieties from different locations in 2 regions of Portugal (Alentejo and Trás-os-Montes) were analyzed using an elemental analyzer coupled to an isotope ratio mass spectrometer. Multivariate analysis allowed to distinguish the EVOO from different regions and which variables influence this distribution the most. The model presented shows that isotopic composition values were enough to significantly ($P < 0,05$) predict the latitude, longitude, altitude, distance to ocean, temperature and rainfall. This study showed that the isotopic composition provides information not only regarding geographic origin, but also on the environmental conditions.

ABREVIATURAS

α – Fracionamento na difusão no ar

α_1 – Fracionamento na fase líquida

AAP – Associação do Azeite de Portugal

α_b – Discriminação na camada limite

AC – Análise de Clusters

ACP – Análise de Componentes Principais

ACP – Proteína transportadora de acilo (*Acyl Carrier Protein*)

AD – Análise Discriminante

ATP – Adenosina trifosfato

AVE – Azeite Virgem Extra

B – Campo magnético

b – Sequência de discriminações durante a carboxilação

CAM – Metabolismo Ácido das Crassuláceas (*Crassulacean Acid Metabolism*)

CDT - Canyon Diablo Troilite

COI - Conselho Oleícola Internacional

CP – Componente Principal

DOP – Denominação de Origem Protegida

e – Fracionamento durante a respiração

EA-IRMS – Análise Elementar – Espetrometria de Massa de Razões Isotópicas (*Elemental Analysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

EC – Energia Cinética

e_s – Fracionamento na dissolução do dióxido de carbono

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

f – Fracionamento durante a fotorrespiração

GC-IRMS - Cromatografia Gasosa – Espetrometria de Massa de Razões Isotópicas (*Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

GPP – Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral

IAEA – Agência Internacional de Energia Atómica (*International Atomic Energy Agency*)

IAEA 600 - Material de referência para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ (cafeína)

IAEA 601 – Material de referência para determinação de $\delta^{18}\text{O}$ (ácido benzoico)

IAEA-CH-7 – Material de referência para determinação de $\delta^2\text{H}$ (polietileno)

IGP – Indicação Geográfica Protegida

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

k – Eficiência da carboxilação

m – Massa

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology*)

OOIWS – Olive Oil Isotope Working Standard

P_a – Pressão parcial na atmosfera livre

P_c – Pressão parcial no local da carboxilação

PDB - *Peedee Belemnite*

PEP-carboxilase – *Fosfoenolpiruvato carboxilase*

P_i – Pressão Parcial nos espaços intercelulares

P_s – Pressão parcial na superfície da folha

r - Raio

R – Rácio molar

R_d – Fase não dependente da luz na fotossíntese

RLM – Regressão Linear Múltipla

R_{std} – Rácio isotópico do padrão

RuBisCO – *Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxidase*

R_x – Rácio isotópico da amostra

SIAS - Sistema de Informação do Azeite e Azeitona de Mesa

SMOW - *Standard Mean Ocean Water*

TCD – Detetor de Condutividade Térmica (*Thermal Conductivity Detector*)

USGS – Serviços Geológicos dos Estados Unidos (*United States Geological Survey*)

v – Velocidade

VPDB – *Viena Peedee Belemnite*

VSMOW – *Viena Standard Mean Ocean Water*

z – Carga elétrica

Γ – Ponto de compensação de dióxido de carbono na ausência da respiração

δ - Rácio normalizado em partes por mil

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Abreviaturas	iv
<i>Índice de Figuras</i>	<i>ix</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>xii</i>
1 – Problemática e objetivos	1
1.2 - Objetivos	4
1.2.1 – Objetivo geral	4
1.2.2 – Objetivos específicos	4
2 – Fundamento teórico	6
2.1 – Azeite	6
2.1.1 - Composição química do azeite.....	7
2.1.2 - Características nutricionais.....	9
2.1.3 - Importância económica	10
2.1.4 - Azeite com denominação de origem protegida	14
2.1.4.1 – Legislação.....	14
2.2 – Isótopos estáveis	16
2.2.1 - Abundância natural dos isótopos estáveis.....	19
2.2.1.1 - Efeitos isotópicos.....	20
2.2.1.1.1 - Efeitos isotópicos químicos	23
2.2.1.1.1.1 -Efeitos isotópicos cinéticos	23
2.2.1.1.1.2 - Efeitos isotópicos de equilíbrio (ou termodinâmicos)	24
2.2.1.1.2 - Efeitos isotópicos físicos	25
2.3 – Circulação dos isótopos na biosfera	26
2.3.1 - Fonte de CO ₂ - Ciclo do carbono	26

2.3.1.1 - Fracionamento isotópico do carbono por ação das plantas.....	29
2.3.1.1.1 - Fotossíntese.....	29
2.3.1.1.2 - Fracionamento isotópico do carbono na fotossíntese	36
2.3.1.2 - Metabolismo lipídico e biossíntese de triacilgliceróis	39
2.3.2 - Fonte de hidrogénio e oxigénio – Ciclo hidrológico	41
2.3.2.1 – Fracionamento isotópico do Hidrogénio	46
2.3.2.2 – Fracionamento isotópico do Oxigénio	47
3 - Técnica analítica	49
3.1 - Espetrometria de massa de razões isotópicas.....	49
3.1.1 - Analisador Elementar	50
3.1.1.1 - Modo de combustão	51
3.1.1.2 - Modo de pirólise.....	52
3.1.2 - Interface	52
3.1.3 - IRMS	53
3.1.3.1 - Formação de iões: Fonte iónica de impacto de eletrões.....	53
3.1.3.2 - Deflexão de iões: O eletroíman	54
3.1.3.3 - Detecção de iões: coletor múltiplo (“Faraday cups”).....	54
3.1.2 - Notação δ	55
3.2 - Quimiometria	59
4 - Metodologia	61
4.1 – Caracterização das amostras	61
4.2 - Análise isotópica.....	63
5 - Resultados e Discussão	66
5.2.1 - Análise exploratória dos dados	66
5.2.2 - Análise quimiométrica	76
5.2.2.1 - Análise de Componentes Principais (ACP).....	78
5.2.2.2 - Análise de Clusters (AC).....	82
5.2.2.3 - Análise Discriminante (AD).....	84
5.2.2.4 - Regressão Linear Múltipla (RLM).....	93

<i>6 - Conclusões</i>	<i>97</i>
<i>Bibliografia.....</i>	<i>101</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição potencial de oliveiras na bacia do Mediterrâneo (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Mar_Mediterrâneo)	10
Figura 2 - Distribuição dos maiores produtores de azeite a nível mundial com base nos dados das últimas 5 campanhas (Fonte: COI)	11
Figura 3 - Evolução da produção de azeite nos principais países produtores desde o início da década de 90' (Fonte: COI)	12
Figura 4 - Evolução da produção, consumo e exportação de azeite em Portugal (Fonte: COI)	13
Figura 5 - Exportações de azeite a nível mundial (unicamente trocas extracomunitárias) (Fonte: COI)	13
Figura 6 - Distribuição da produção de azeite em Portugal na campanha 2017/2018 (Fonte: SIAZ -GPP).....	14
Figura 7 – Poço de energia potencial para ligações estáveis com isótopos leves e isótopos pesados (adaptado de Fry, 2006)	22
Figura 8 - Ciclo do carbono (adaptado de https://www.sciencelearn.org.nz/image-maps/3-carbon-cycle)	26
Figura 9 - Variação da composição isotópica $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no meio ambiente (adaptado de Ana Ferreira, 2008)	28
Figura 10 - Fornecimento à célula vegetal de metabolitos e ATP a partir da luz, CO_2 e H_2O (adaptado de Alberts et al., 2013)	30
Figura 11 - Ciclo de Calvin (adaptado de Mike Jones, https://commons.wikimedia.org)	31
Figura 12 - Atividade carboxilase e oxidase da RuBisCO	32
Figure 13 - Esquema da fotossíntese das plantas tipo C_4 , com a separação no tempo e no espaço da fixação do CO_2 e da síntese dos hidratos de carbono (adaptado de http://bio1510.biology.gatech.edu/module-3-molecules-membranes-and-metabolism/10-c4-plants/)	33
Figura 14 - Fisiologia do tecido foliar em plantas C_3 e C_4 (adaptado de https://www.jobilize.com/online/course/photosynthetic-pathways-photosynthesis-global-climate-by-openstax?page=1).....	34

Figura 15 – Descarboxilação do piruvato a acetil-CoA (adaptado de Nelson, Lehninger, and Cox, 2008)	39
Figura 16 – Ação do complexo enzimático <i>acetil-CoA-carboxilase</i>	40
Figura 17 – Sequência da adição de 2 carbonos no alongamento dos ácidos gordos (adaptado de Nelson et al., 2008)	40
Figura 18 – Processos de fracionamento ao longo do ciclo hidrológico. $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ relativamente ao padrão de referência VSMOW (adaptado de http://www.sahara.arizona.edu/programs/isotopes/oxygen.html).....	43
Figura 19 – Valores $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação anual global e no continente europeu (adaptado de http://wateriso.utah.edu/waterisotopes)	45
Figura 20 - Esquema simplificado de um EA-IRMS em modo de combustão para a determinação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (adaptado de Carter & Barwick, 2011)	51
Figura 21 - Esquema simplificado de um EA-IRMS em modo de pirólise para a determinação de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ (adaptado de Carter & Barwick, 2011)	52
Figura 22 – Esquema simplificado de um Espetrometro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) (adaptado de http://www.ebd.csic.es/IsotopeCourse/Conferences/2014%20Fundamentals%20of%20IRMS%20-%20EBD%20course%20-%20Sevilla%20[Lecture%20seule].pdf).....	53
Figura 23 - Localizações da origem das amostras das regiões Alentejo e Trás-os-Montes	61
Figura 24 - Normais climatológicas. Média de 30 anos (1971 a 2000) de temperatura e precipitação anual (adaptado de http://portaldoclima.pt/pt/).....	68
Figura 25 – Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nas regiões do Alentejo e Trás-os-Montes	69
Figura 26 – Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nas diferentes variedades	70
Figura 27 – Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ por variedade na região Alentejo e na região de Trás-os-Montes	71
Figura 28 – Representação gráfica dos <i>loadings</i> da Análise de Componentes Principais	81
Figura 29 – Dendrograma para a amostra global	82

Figura 30 - Dendrograma das variáveis	83
Figura 31 - Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de Elevação	86
Figura 32 - Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de Influência oceânica	89
Figura 33 - Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de Temperatura	91
Figura 34 – Valores observados vs. Valores previstos para as variáveis geográficas e climáticas: Latitude, Longitude, Altitude, Temperatura, Precipitação e Distância ao Oceano	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Abundâncias isotópicas e massas atômicas relativas dos isótopos estáveis de C, H e O (adaptado de Sharp, 2017)	17
Tabela 2 - Composição isotópica dos padrões de referência primários (adaptado de Hayes, 2002).....	57
Tabela 3 - Variedade e dados geográficos e climáticos para as amostras de AVE.....	62
Tabela 4 - Valores máximo, mínimo, média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nas diferentes localizações	67
Tabela 5 - Valores máximo, mínimo, média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nas 2 regiões: Alentejo e Trás-os-Montes	67
Tabela 6 - Valores máximo, mínimo, média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nas diferentes variedades de azeitonas	70
Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson	77
Tabela 8 - Valores próprios e proporção de variância explicada pelas componentes....	79
Tabela 9 - <i>Loadings</i> das componentes principais	80
Tabela 10 - Funções discriminantes da Elevação em função das razões isotópicas	86
Tabela 11 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de Elevação	87
Tabela 12 - Funções discriminantes da Influência oceânica em função das razões isotópicas	88
Tabela 13 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de Influência oceânica	89
Tabela 14 - Funções discriminantes da Temperatura em função das razões isotópicas..	90
Tabela 15 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de Temperatura	91
Tabela 16 - Função discriminante da Região em função das razões isotópicas.....	92
Tabela 17 – Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 2 níveis de Região	92
Tabela 18 - Coeficientes de determinação e análise de variância para os modelos de Regressão Linear Múltipla considerando todas as variáveis independentes.....	93

Tabela 19 - Coeficientes de regressão com todas as variáveis	94
Tabela 20 - Coeficientes de determinação e análise de variância para os modelos de regressão linear considerando as variáveis independentes significativas	95
Tabela 21- Coeficientes de regressão e análise de variância para os modelos de regressão linear considerando as variáveis independentes significativas	95

1 – PROBLEMÁTICA E OBJETIVOS

A autenticidade e rastreabilidade dos produtos agroalimentares são fatores de preocupação não só para os consumidores, mas também para os produtores, distribuidores e autoridades. A origem geográfica é essencial na avaliação da qualidade dos produtos agroalimentares, embora não implique uma alteração no valor nutricional propriamente dito, mas sim na percepção que o consumidor tem que não está a pagar por um produto estrangeiro e mais barato como se fosse um produto regional mais valorizado. A utilização de denominações de origem falsas é prejudicial tanto para os consumidores como para os produtores legítimos (Zhao et al., 2014). A comercialização de produtos alimentares contrafeitos é comum e generalizada pelo que é necessário investir no estudo de métodos analíticos que possam determinar com o maior grau de certeza possível relativamente à autenticidade destes produtos, ou seja, processos analíticos que validem a informação dos rótulos relativamente à origem e processo de produção.

Existem atualmente diversas técnicas analíticas para a determinação da origem geográfica dos produtos alimentares (técnicas de separação, espectroscopia, espectrometria de massa, etc.) (Luykx & van Ruth, 2008), no entanto, a autenticação destes produtos por parte das autoridades responsáveis, requer técnicas cada vez mais sofisticadas, uma vez que as fraudes são cada vez mais difíceis de detetar (Reid, O'Donnell & Downey, 2006).

Das muitas técnicas disponíveis que testam a autenticidade dos produtos agroalimentares (tanto animais como vegetais) um dos métodos que tem despertado mais interesse é a Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (Isotope Ratio Mass Spectrometry - IRMS) (Drivelos & Georgiou, 2012; Kelly, Heaton & Hoogewerff, 2005). Nos últimos anos, a determinação dos isótopos estáveis de elementos leves, especialmente carbono, hidrogénio e oxigénio tem sido utilizada, não só para esclarecimento de vias bioquímicas e mecanismos de reação, mas também a sua aplicação tem ganho importância no controlo da autenticidade e determinação da proveniência de ingredientes ou produtos alimentares.

Os métodos analíticos convencionais no controlo de produtos alimentares baseiam-se na determinação de quantidades ou rácios de certos compostos, ou na

presença/ausência de substâncias que não ocorrem naturalmente, para determinar adulterações nos produtos alimentares. Por outro lado, os métodos baseados nos isótopos estáveis, utilizam um parâmetro físico, o rácio isotópico, inerente ao produto, para determinar a origem de um componente. Isto permite a diferenciação de substâncias que de outro modo, seriam quimicamente indiferenciáveis.

Os primeiros estudos com isótopos estáveis em azeite focaram-se na adulteração dos azeites com óleos de qualidade inferior (Angerosa, Camera, Cunitini, Gleixner & Reniero, 1997), posteriormente, a análise de razões isotópicas provou ser uma ferramenta bastante útil para caracterizar a origem geográfica (Angerosa et al., 1999).

A utilização da variação nas abundâncias naturais dos isótopos estáveis como marcadores na determinação da autenticidade dos alimentos deve-se ao conhecimento de como ocorrem naturalmente os rácios isotópicos, da sua variação natural e de como ocorrem os processos de fracionamento na natureza, isto é, razões físicas, químicas ou bioquímicas para o fracionamento isotópico (Rossmann, 2001).

São as diferenças induzidas pelo fracionamento durante estes processos que levam a assinaturas isotópicas características nos materiais biológicos (Gannes, del Rio & Koch, 1998). É, pois, importante perceber quais são os processos responsáveis pelos fracionamentos que conduzem às razões isotópicas de C, O e H no azeite de modo a averiguar como podem ser utilizadas para a sua autenticação. Para isso é necessário perceber quais os processos associados, por um lado, à fonte dos isótopos, nomeadamente os processos associados à circulação dos isótopos na biosfera ligados aos ciclos do carbono e hidrológico, e por outro lado, os fatores inerentes à própria planta, como a fixação do CO₂ e a síntese dos ácidos gordos. De um modo geral, a aplicação da análise de rácios isotópicos na determinação da origem geográfica de produtos alimentares no geral e do azeite em particular, deve-se ao fato do rácio dos isótopos estáveis do H e do O na matéria orgânica dos alimentos estar relacionado com a composição isotópica da água do local de origem, que possui uma variabilidade geográfica conhecida e os rácios isotópicos de C e N relacionados com o clima e práticas agrícolas (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica & Georgiou, 2016).

O presente estudo aborda as razões isotópicas do carbono, oxigénio e hidrogénio em azeites de diversas variedades e provenientes de diversas localizações de Portugal Continental, com diferentes características geográficas e edafoclimáticas,

nomeadamente a latitude, longitude, altitude, distância ao oceano, temperatura e precipitação. Considerando o elevado número de parâmetros, é necessária uma abordagem quimiométrica de modo a revelar informação que à partida não é evidente relativamente aos parâmetros selecionados (Gumus, Celenk, Tekin, Yurdakul & Ertas, 2017; Jiménez-Morillo, Cabrita, Dias, González-Vila & González-Pérez, 2020).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que os métodos quimiométricos podem ser usados para diferenciar a origem dos azeites através de análises estatísticas multivariadas de diversos compostos químicos tais como ácidos gordos (Kritioti, Menexes & Drouza, 2018), compostos fenólicos (Bajoub et al., 2017) ou elementos traço (Benincasa, Lewis, Perri, Sindona & Tagarelli, 2007; Gumus et al., 2017). A desvantagem destes métodos é a necessidade de determinar um grande número de compostos que requerem um prévio tratamento químico das amostras, que pode ser dispendioso e demorado. Além do mais, estes parâmetros podem variar com fatores relacionados não só com a localização geográfica da zona de produção, mas também com a qualidade das azeitonas, nomeadamente o nível de maturação, condições de colheita e armazenamento, mas também com o método de extração do azeite (Angerosa et al., 1999). As vantagens da utilização dos isótopos estáveis, em *bulk*, na determinação da origem geográfica de produtos alimentares são, por um lado, o facto de ser um método com elevada exatidão que requer uma pequena quantidade de amostra, que geralmente não é afetado pelo método de produção (Camin et al., 2017) e o fato de não haver necessidade de um tratamento prévio das amostras (Iacumin, Bernini & Boschetti, 2009).

O crescente interesse dos consumidores por produtos alimentares de elevada qualidade e relacionados com uma determinada origem geográfica, torna necessário estabelecer técnicas analíticas que permitam o controlo exigido para esses produtos. A abordagem quimiométrica dos dados analíticos obtidos, juntamente com variáveis relacionadas com a localização das amostras, permite detetar padrões característicos nos dados que podem ser relacionados com a origem geográfica (Luykx & van Ruth, 2008).

1.2 - OBJETIVOS

1.2.1 – OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho é determinar a relação entre as razões isotópicas e a localização geográfica, com ferramentas quimiométricas e se essas relações podem ser usadas para caracterizar e classificar os azeites virgem extra de acordo com a sua origem geográfica.

Neste estudo, além da variedade das azeitonas e da localização do olival a partir do qual se produziu o azeite, não se tinha conhecimento do grau de maturação, condições de colheita ou armazenamento, ou outros fatores que influenciam a determinação da localização geográfica por outros métodos. Deste modo pretende-se verificar se a determinação das razões isotópicas e a sua relação com a localização geográfica será suficiente para inferir quanto à origem independentemente dos fatores anteriormente mencionados.

1.2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as razões isotópicas características de cada região e como estas variam em função da sua localização e do clima.
- Distinguir os azeites provenientes de cada região com recurso à análise multivariada utilizando métodos de aprendizagem não supervisionados, nomeadamente a Análise de Componentes Principais e a Análise de Clusters que (a partir do conjunto total dos dados isotópicos, geográficos e climáticos) têm como objetivo encontrar conjuntos de amostras que possam ser distribuídos por classes, neste caso distinguir os azeites provenientes de regiões diferentes, e quais os fatores que mais influenciam essa distribuição.
- Classificar novas amostras de azeite quanto à sua origem geográfica com a aplicação de métodos de aprendizagem supervisionados, nomeadamente a Análise Discriminante, com base nos dados analisados.

- Inferir quanto aos parâmetros de localização e climáticos através da Análise de Regressão Linear Múltipla

2 – FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 – AZEITE

O azeite tem sido utilizado há milhares de anos nos países em redor do Mar Mediterrâneo onde existem inúmeras referências à sua utilização na literatura histórica e também na mitologia dos povos desta área (Boskou, 2008a). Existem provas da existência de oliveiras (*Olea europaea* L.) nas regiões em redor do Mar Mediterrâneo que remontam a 12000 mil anos a.C. A origem da árvore é incerta, com autores que a consideram indígena de toda a bacia do Mediterrâneo, no entanto, foi na Ásia Menor onde começou a ser cultivada, há cerca de 6000 mil anos, e a partir daí posteriormente disseminada pelos Gregos. A partir do séc. VI a.C. a cultura espalhou-se por todas as regiões em redor do Mediterrâneo, sendo introduzida em Espanha e Portugal, onde no séc. II a.C. já era explorada numa extensão considerável (COI, 2018). Atualmente a cultura está distribuída por todos os países em redor da bacia do Mediterrâneo, nomeadamente Portugal, Espanha e Itália na zona mais ocidental e central, na Grécia e Turquia na zona este e Tunísia e Marrocos mais a sul (Di Giovacchino, 2000).

Ao longo dos séculos, foram selecionadas pelos agricultores centenas de variedades e delas depende o rendimento dos frutos, o rendimento em azeite, o perfil de ácidos gordos e a cor e aroma, em função do perfil e concentração de pigmentos, fenóis, compostos voláteis, etc. Cada variedade possui diferentes características genéticas de modo a adaptarem-se ao clima e meio ambiente no geral. Atualmente estão disponíveis no mercado vários tipos de azeite, classificados consoante as suas propriedades sensoriais e parâmetros químicos. A grande variedade de azeites, nomeadamente da sua composição e propriedades, é uma complexa interação entre o meio ambiente (temperatura, precipitação, disponibilidade de água, etc.), fatores agronómicos (podas, fertilização, irrigação, grau de maturação, etc.) e as características genéticas de cada variedade. Todas estas variáveis influenciam a composição química dos azeites que é determinante na sua autenticidade e rastreabilidade (Santos, Cruz, Cunha & Casal, 2013; Vossen, 2013).

A produção de azeite a partir dos frutos é feita por processos mecânicos e físicos. As etapas do processo de produção incluem a colheita, lavagem e prensa das azeitonas, batedura da pasta de azeitona, centrifugação, decantação, armazenamento, filtração e

embalamento (Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Segura-Carretero & Fernández-Gutiérrez, 2010). De acordo com a legislação vigente (Regulamento (CE) nº 1234/2007 do Conselho de 22 de Outubro de 2007), azeites virgens são os azeites obtidos a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.) “unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, excluindo portanto os azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza”. Os azeites virgens são ainda classificados de acordo com a acidez livre, que estipula que um azeite virgem extra (AVE) possui uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g.

Em comparação com outros óleos vegetais obtidos com recurso à extração com solventes e posteriormente submetidos a vários processos de refinação, o AVE retém muitos dos componentes originais do fruto. Enquanto a maior parte dos óleos vegetais no mercado são constituídos principalmente por misturas de triacilgliceróis, o azeite contém outros componentes naturais da fruta (pigmentos, compostos fenólicos e compostos voláteis). Além da sua composição em ácidos gordos monoinsaturados (mais resistentes à oxidação, logo menos propícios à produção de peróxidos e radicais livres) também estes compostos presentes em baixas concentrações, são uma mais valia para o azeite, contribuindo para as suas propriedades sensoriais características e aumentando a sua potencial bioatividade (Gómez-Caravaca, Maggio & Cerretani, 2016; Santos et al., 2013).

2.1.1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

O azeite é composto principalmente por ácidos gordos. Destes, os ácidos gordos monoinsaturados representam aproximadamente 72%, os saturados 14% e os polinsaturados outros 14%, mas o seu perfil varia, não só com a variedade das azeitonas e o seu estado de maturação, mas também com as condições climáticas e com a localização da produção (Barjol, 2013).

Entre os ácidos gordos, o ácido oleico é o que se encontra em concentrações mais elevadas seguido do ácido palmítico, linoleico e esteárico. Apesar da variação no perfil

dos ácidos gordos, o ácido oleico é sempre predominante. O ácido palmítico encontra-se principalmente nas azeitonas pouco maduras, enquanto os ácidos palmitoleico, esteárico e linoleico se encontram nas azeitonas mais maduras (Wani et al., 2018). Estes ácidos gordos, no entanto, na sua grande maioria, não se encontram na sua forma livre (ácidos gordos livres), formam ésteres com o glicerol originando triacilgliceróis, que na realidade constituem 98 a 99% do azeite (fração maioritária) (León-Camacho, Morales & Aparicio, 2013).

Além da fração maioritária do azeite, constituída por ácidos gordos (na forma de triacilgliceróis ou livre) existe uma fração minoritária (1% a 2%) de compostos muito variados responsáveis pelas distintas propriedades sensoriais e biológicas e pela estabilidade face à oxidação. Estes compostos são essencialmente metabolitos secundários das plantas e a sua composição quantitativa é igualmente afetada pelas condições climáticas, agronómicas e tecnológicas (Paiva-Martins & Kiritsakis, 2017; Tsimidou, 2013).

Estes constituintes da fração minoritária provenientes das azeitonas permanecem nos azeites virgens, uma vez que estes são obtidos unicamente por processos físicos. Nos outros óleos vegetais, que incluem extrações com solventes orgânicos e refinação, existe um empobrecimento considerável nestes compostos (Dilis & Trichopolou, 2009).

Entre estes compostos encontram-se o esqualeno (precursor na biossíntese do colesterol), β -caroteno (precursor da vitamina A), esteróis, tocoferóis (onde se destaca o α -tocoferol ou vitamina E) e compostos fenólicos com reconhecidas propriedades antioxidantes e importantes para as propriedades sensoriais (Perona & Botham, 2013; Servili et al., 2004).

Os compostos fenólicos mais abundantes são os derivados da oleuropeína e ligstrósido presentes no fruto, nomeadamente o hidroxitirosol e o tirosol e que representam aproximadamente 90% do total de compostos fenólicos no azeite (Perona & Botham, 2013). Existem ainda aproximadamente uma centena de compostos aromáticos cuja composição química, tal como a composição em ácidos gordo e compostos fenólicos, varia com as condições climáticas e geográficas, com a variedade das azeitonas e com a qualidade do azeite (Barjol, 2013). Esta variação dos parâmetros agronómicos e climáticos que podem afetar os compostos voláteis levam a que azeites de diferentes origens possuam características sensoriais diferentes

(Angerosa et al., 2004; Tsimidou, 2013), sendo este um dos fatores de maior relevância para a determinação da origem geográfica dos azeites.

O *Codex Alimentarius* e o COI (Conselho Oleícola Internacional) definem a composição essencial e os fatores de qualidade que os azeites têm de cumprir incluindo os valores distintos entre os azeites extra virgem, virgem, refinado ou corrente.

2.1.2 - CARATERÍSTICAS NUTRICIONAIS

Desde que em meados do séc. XX o “Seven Countries Study of Cardiovascular Diseases” (Menotti & Puddu, 2015) relacionou a então denominada dieta Mediterrânica com a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares que vários estudos têm ligado esta dieta a efeitos benéficos para a saúde (Cicerale, Lucas & Keast, 2012; Guasch-Ferre et al., 2017; Visioli et al., 2018). Alguns destes estudos epidemiológicos indicavam também que nos países em que se adotou a dieta Mediterrânica e em que o azeite é a principal fonte de gordura, a incidência de alguns tipos de cancro era menor que nos países do norte da Europa, o que se associou ao consumo dos ácidos gordos monoinsaturados, ao invés de gorduras ricas em ácido gordos saturados mais comuns nesses países (Huang & Sumpio, 2008; Lopez-Miranda et al., 2010).

No entanto, o azeite é mais que uma gordura monoinsaturada. Embora os ácidos gordos monoinsaturados presentes no azeite interfiram em várias respostas inflamatórias envolvidas na aterosclerose (Claro, Ogalla, Rodriguez-Rodriguez, Herrera & Alvarez de Sotomayor, 2015; Huang & Sumpio, 2008; Montserrat-de la Paz et al., 2016), o papel protetor que o azeite tem no combate a certas doenças tem sido atribuído não só à sua composição em ácidos gordos mas também à presença de compostos minoritários, principalmente compostos fenólicos e esqualeno (Covas, Khymenets, Fitó & de la Torre, 2009; Owen et al., 2000). Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo destes compostos presentes no azeite, que são antioxidantes naturais, produzem efeitos benéficos para a saúde e que estas substâncias são agora consideradas potencialmente terapêuticas (Beauchamp et al., 2005; Boskou, 2008a).

Dos compostos fenólicos com capacidade antioxidante os mais representativos são o hidroxitirosol, o tirosol e os seu derivados (Covas et al., 2009; Gonzalez-Santiago, Fonolla & Lopez-Huertas, 2010; Owen et al., 2000; Wani et al., 2018). A atividade

antioxidante dos compostos fenólicos do azeite (Boskou, 2008b; Cicerale et al., 2012; Rosignoli, Fucelli, Fabiani, Servili & Morozzi, 2013), nomeadamente no seu efeito na diminuição dos danos oxidativos, recebeu muita atenção nos últimos anos associando estes compostos à prevenção de determinados tipos de cancro (Casaburi et al., 2013; Coccia et al., 2014; Kampa, Pelekanou, Notas & Castanas, 2009; Lopez-Miranda et al., 2010; Owen et al., 2000), diabetes tipo 2 (Storniolo, Rosello-Catafau, Pinto, Mitjavila & Moreno, 2014), doenças relacionadas com o envelhecimento (Garcia-Gavilan et al., 2018), doenças crónicas e degenerativas (Guillén et al., 2009).

São estas características nutricionais e a noção de o azeite ser um alimento funcional promotor de saúde que o tornam um bem alimentar com valor económico considerável e de grande importância nos países onde é produzido.

2.1.3 - IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

Apesar do consumo de azeite ser hoje em dia global, devido ao reconhecimento da sua importância numa alimentação saudável, a sua produção é limitada, por questões edafoclimáticas, a duas zonas do globo que se situam entre os paralelos 30 e 45 dos hemisférios norte e sul, estimando-se que 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica (AAP, 2018) (Figura 1).

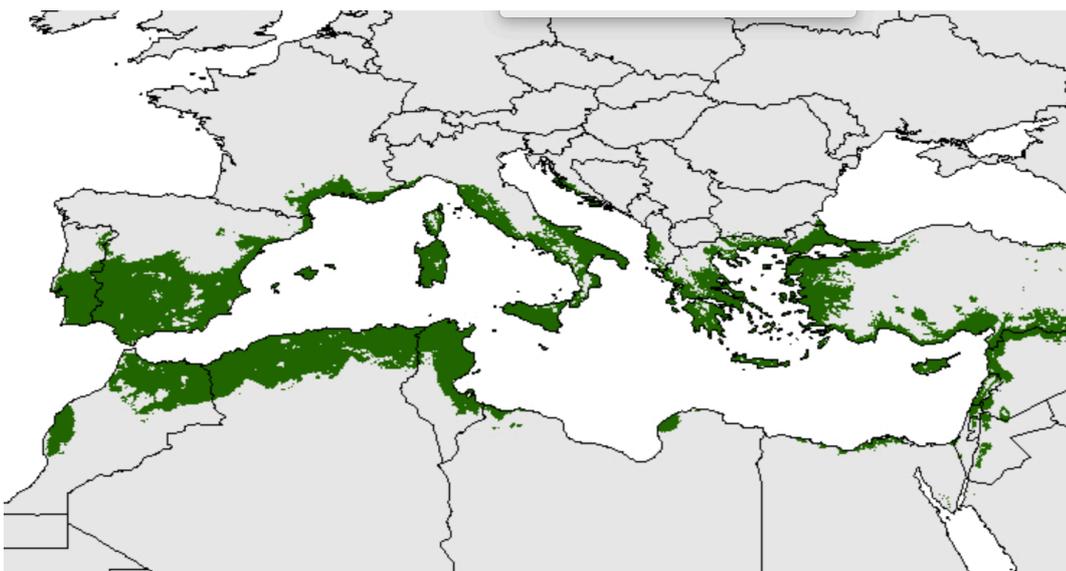


Figura 1 - Distribuição potencial de oliveiras na bacia do Mediterrâneo
(Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Mar_Mediterrâneo)

O Conselho Oleícola Internacional (organização intergovernamental representante do setor a nível mundial) estima que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia, Portugal, Chipre, Croácia, Eslovénia e Malta) são responsáveis por 69% da produção a nível mundial, onde se destaca a Espanha, que considerando os dados das últimas 5 campanhas, produz 45% do azeite mundial. Os outros principais países produtores são a Tunísia (6%), a Turquia (6%), a Síria (4%), Marrocos (4%) e a Argélia (2%) (Figura 2).

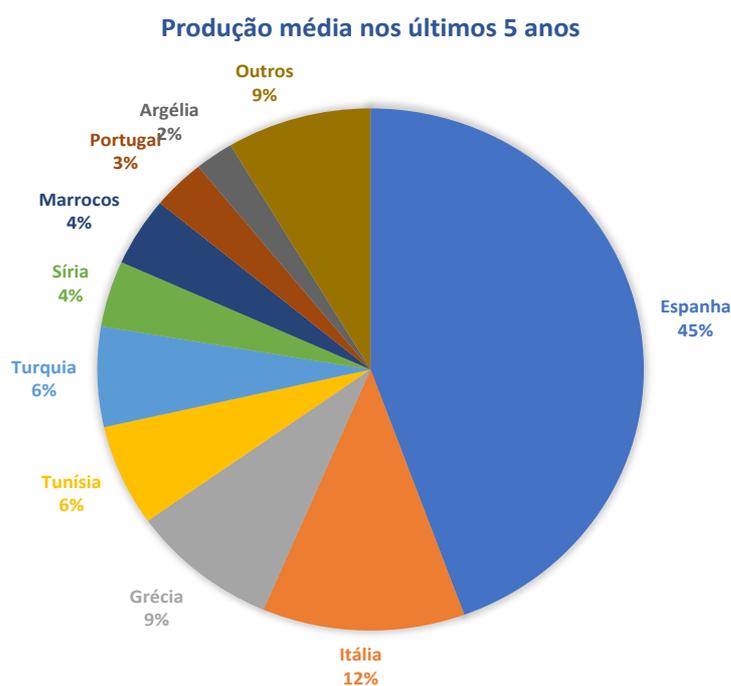


Figura 2 - Distribuição dos maiores produtores de azeite a nível mundial com base nos dados das últimas 5 campanhas (Fonte: COI)

Ao nível da União Europeia, a produção de azeite cresceu significativamente nas últimas décadas embora nos últimos anos tenha perdido terreno. Não só pela diminuição da produção verificada em Itália (de 24% da produção mundial no início da década de 90' para 12,8% desde 2000) e Grécia (de 17% para 9,5% da produção mundial) mas pelo crescente peso de países como a Tunísia, Turquia e Marrocos (Figura 3). Portugal manteve uma produção média de 38000 t desde 1990 até 2000 a partir de onde o crescimento na produção se tornou evidente, tendo produzido em média 83000 t nos últimos 8 anos com uma produção de 134800 t na campanha de 17/18.

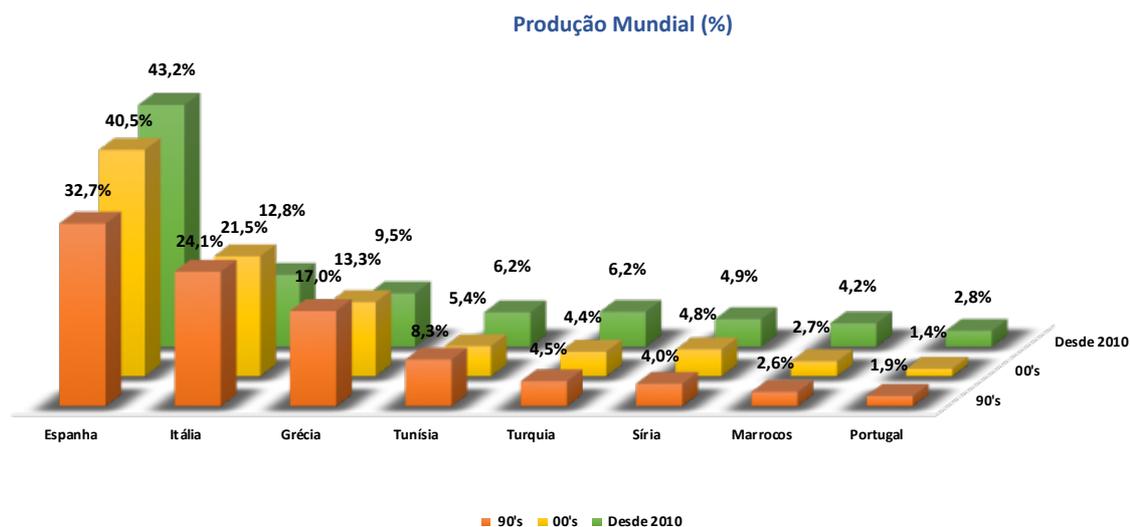


Figura 3 - Evolução da produção de azeite nos principais países produtores desde o início da década de 90'
(Fonte: COI)

Relativamente ao consumo, verifica-se nos últimos anos um crescimento médio, a nível mundial, que reflete bem o efeito da difusão dos resultados da investigação científica sobre os benefícios do azeite para a saúde, bem como as sucessivas campanhas promocionais levadas a cabo, quer pela União Europeia, quer pelo Conselho Oleícola Internacional. Embora a União Europeia represente cerca de 56% do consumo mundial, países que tradicionalmente não eram consumidores, como os Estados Unidos da América ou o Brasil verificaram de um forte acréscimo nos últimos anos. De facto, nos Estados Unidos da América o consumo já supera as 300000 t anuais colocando este país como o terceiro maior consumidor e responsável por 38% das importações mundiais (AAP, 2018).

Entre os mercados de destino das exportações nacionais, destaca-se o mercado brasileiro que absorve cerca de 29% do total das exportações nacionais de azeite, fazendo com que este produto seja igualmente o produto português mais exportado para aquele país.

A nível nacional, o forte crescimento na produção levou a que esta nos últimos anos tenha ultrapassado o consumo interno, impulsionando muito as exportações (Figura 4). Considerando os valores desde o início da década observa-se um excedente que permite que Portugal seja atualmente o 4º maior exportador mundial de azeite (Figura 5).

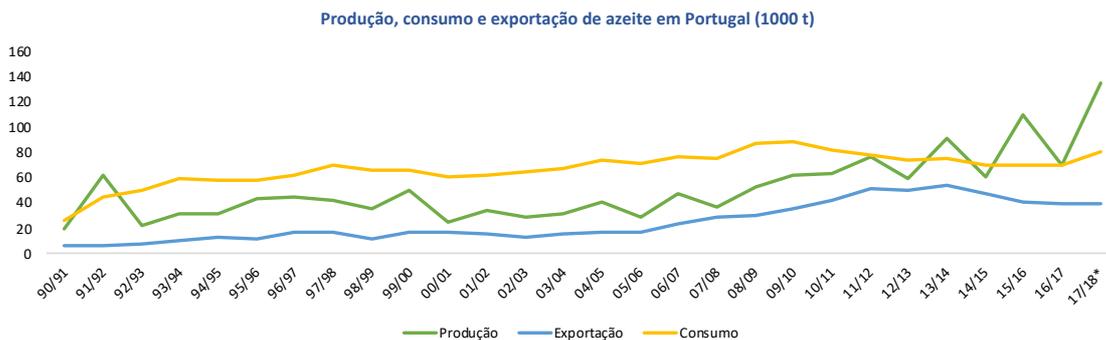


Figura 4 - Evolução da produção, consumo e exportação de azeite em Portugal (Fonte: COI)

Segundo os dados do SIAZ (Sistema de Informação do Azeite e Azeitona de Mesa), a região do Alentejo representa neste momento mais de 78% da produção nacional de azeite (figura 6), enquanto a região de Trás-os-Montes produz 11%. Nos últimos anos a produção na região de Trás-os-Montes tem-se mantido relativamente constante enquanto no Alentejo se verifica um aumento considerável. Embora o número de lagares seja muito semelhante em ambas as regiões e que inclusive têm vindo a diminuir, verifica-se que existe uma concentração da produção em lagares mais modernos e com maior capacidade de laboração. O aumento considerável de produção na região Alentejo não é alheio ao fato do olival de sequeiro estar bem adaptado à escassez de água mas deve-se principalmente ao aumento da área de olival intensivo e superintensivo nesta região (olival de regadio) (GPP, 2018).

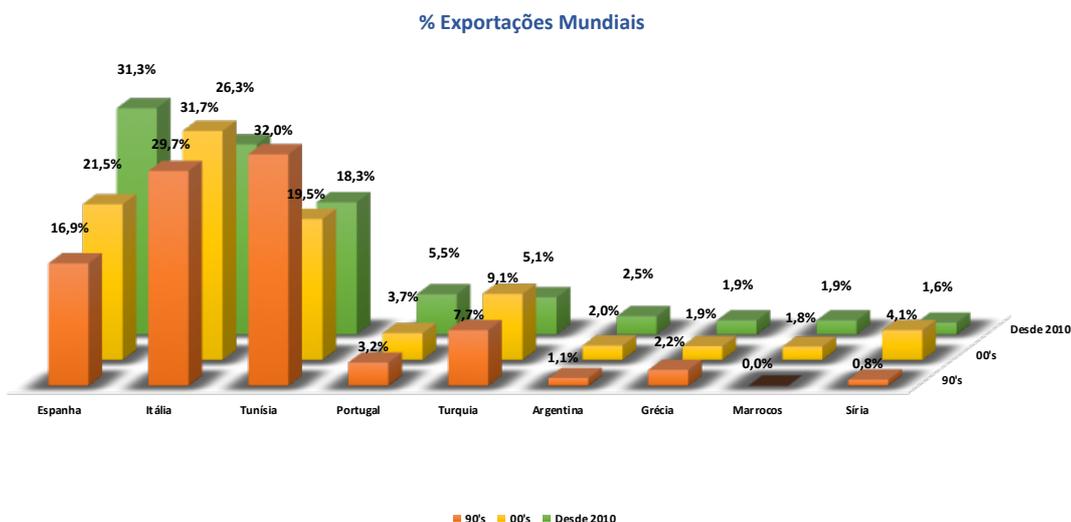


Figura 5 - Exportações de azeite a nível mundial (unicamente trocas extracomunitárias) (Fonte: COI)

2.1.4 - AZEITE COM DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA

Devido à globalização dos mercados alimentares e ao resultante aumento na variabilidade e disponibilidade destes produtos oriundos de outros países, os consumidores mostram-se cada vez mais interessados em conhecer a sua origem geográfica juntamente com a pressuposta qualidade dos produtos alimentares que consomem (Charlebois, Schwab, Henn & Huck, 2016). A garantia da qualidade e os métodos utilizados para autenticar produtos alimentares é pois de grande interesse tanto a nível comercial, mas também do ponto de vista legal.

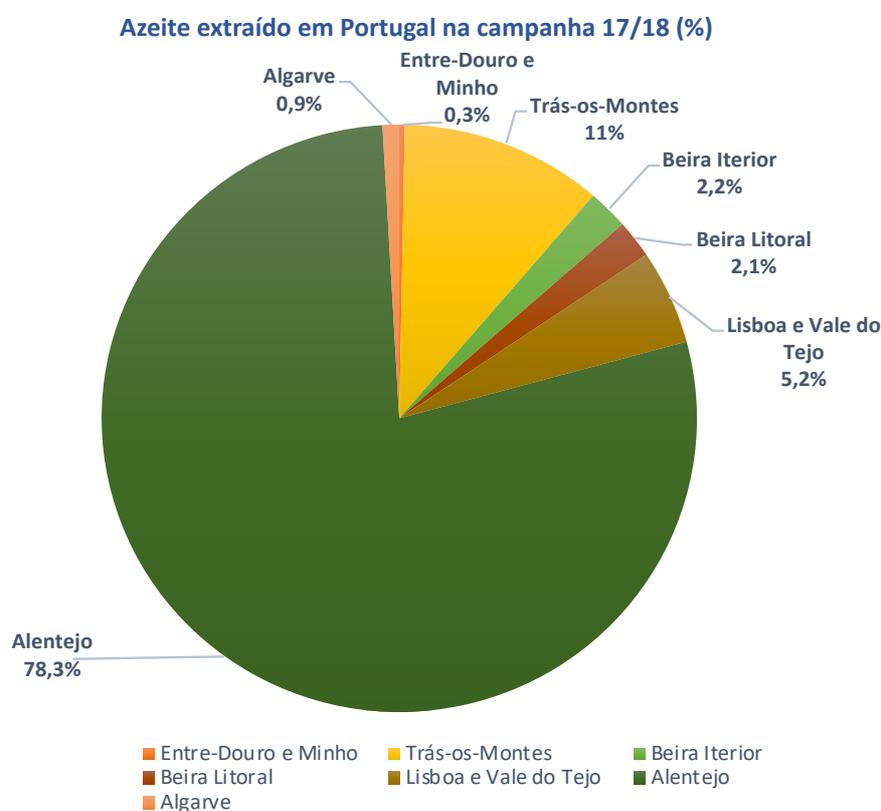


Figura 6 - Distribuição da produção de azeite em Portugal na campanha 2017/2018 (Fonte: SIAZ – GPP)

2.1.4.1 – LEGISLAÇÃO

Desde que em 1992 o Conselho das Comunidades Europeias inicialmente regulamentou relativamente à proteção das indicações geográficas e denominação de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios (Regulamento, CEE Nº 2081/92), posteriormente revisto em 2006 (Regulamento, CE Nº 510/2006), que a

legislação da União Europeia tem reservado designações específicas para alimentos ou bebidas com qualidade ou reputação reconhecida. Estas legislações, que têm vindo a ser atualizadas desde então, introduziram um quadro regulamentar para os produtos alimentares, incluindo as designações DOP (Denominação de Origem Protegida) que liga os produtos a uma área geográfica delimitada onde são produzidos, IGP (Indicação Geográfica Protegida) que liga os produtos a uma área geográfica onde pelo menos uma das etapas do processo produtivo tem de ocorrer e ETG (Especialidade Tradicional Garantida) que protege os métodos tradicionais de produção. A legislação em vigor fornece um conjunto de regras comuns para registar e proteger nomes usados para identificar produtos alimentares e processos de produção tradicionais (Paolini, 2017) .

Produtos de elevada qualidade que possuam a designação “DOP” e “IGP” têm um preço de mercado superior a produtos semelhantes, trazendo um benefício financeiro para os produtores e consequentemente para a região de produção. Portugal possui seis Azeites com DOP: Azeites do Norte Alentejano, Azeite de Trás-os-Montes, Azeites da Beira Interior (Beira- Baixa, Beira-Alta), Azeites do Ribatejo, Azeite de Moura e Azeite do Alentejo Interior (GPP, 2017). É preciso proteger estes produtos das possíveis fraudes comerciais, sejam elas a substituição por produtos de qualidade inferior ou produzidos noutros locais, nem sempre associados à valorização do produto.

Como consequência do aumento da proteção legislativa dos produtos regionais, a origem dos alimentos tornou-se um dos aspetos mais relevantes relativamente à sua autenticidade. Testar a origem dos alimentos ou ingredientes utilizados para alimentação é um critério de qualidade, daí uma maior necessidade de técnicas analíticas precisas para autenticação destes produtos (Danezis, Tsagkaris, Brusica & Georgiou, 2016; Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusica & Georgiou, 2016).

O regulamento (CE) N.º 510/2006, relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, determina como Denominação de Origem: “o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excecionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício:

- originário dessa região, desse local determinado ou desse país,
- cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos, e

- cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada”.

Relativamente à «Indicação Geográfica», o regulamento determina que esta deve indicar: “o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício:

- originário dessa região, desse local determinado ou desse país, e
- que possui determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser atribuídas a essa origem geográfica, e
- cuja produção e/ou transformação e/ou elaboração ocorrem na área geográfica delimitada”.

2.2 – ISÓTOPOS ESTÁVEIS

A descrição mais simplista dos átomos diz que estes são constituídos pelas partículas subatómicas prótons, elétrons e neutrões. Os prótons têm carga positiva, os elétrons têm carga negativa e os neutrões não possuem carga. A massa de um neutrão é aproximadamente a mesma de um próton enquanto a massa de um elétron é negligenciável face à massa dos prótons e neutrões. Um elemento é definido pelo número de prótons no seu núcleo. Num átomo neutro o número de prótons é equilibrado pelo número de elétrons presente como uma nuvem carregada negativamente em redor do núcleo, cuja configuração é responsável pela maioria das suas propriedades químicas. Para um dado elemento o número de prótons (que define o número atómico) é sempre o mesmo, mas o número de neutrões pode variar, ou seja, isótopos de um dado elemento químico tem sempre o mesmo número de prótons mas um número diferente de neutrões (Sharp, 2017). Neutrões extra no núcleo de um elemento originam apenas ligeiras diferenças a nível físico, no entanto, apesar de subtis, são estas diferenças que impedem que estes isótopos sejam verdadeiramente iguais. No mundo químico e das ligações químicas a verdadeira diferença entre elementos reside no número de prótons e elétrons. Os elétrons carregados negativamente equilibram o número de prótons no núcleo, carregados positivamente e reagem com outros átomos para formar ligações entre eles. Os neutrões são partículas subatómicas sem carga elétrica, são importantes para a estabilidade do núcleo atómico pois

impedem que os prótons altamente carregados e mutualmente repulsivos se aproximem demasiado uns dos outros, como explica Fry (2006), os nêutrons mantêm a paz no núcleo. No entanto, os nêutrons têm uma massa semelhante à dos prótons, o que significa que átomos de um elemento com diferente número de nêutrons têm massas diferentes (Tabela 1). É esta pequena desigualdade na massa atômica que origina as subtis diferenças físicas que conduzem ao fracionamento isotópico e a que a sua distribuição no ambiente não seja idêntica.

Tabela 1 - Abundâncias isotópicas e massas atômicas relativas dos isótopos estáveis dos elementos H, C, N e O (Fonte: Sharp, 2017).

Elemento	Símbolo	Número atômico (Z)	Número de nêutrons (N)	Número de massa (M)	Abundância (%)	Massa atômica
Hidrogênio	¹ H	1	0	1	99,985	1,008
	² H	1	1	2	0,015	2,014
Carbono	¹² C	6	6	12	98,89	12
	¹³ C	6	7	13	1,11	13,003
Azoto	¹⁴ N	7	7	14	99,63	14,003
	¹⁵ N	7	8	15	0,37	15,000
Oxigênio	¹⁶ O	8	8	16	99,759	15,995
	¹⁷ O	8	9	17	0,037	16,999
	¹⁸ O	8	10	18	0,204	17,999

A menção mais antiga de que *isótopos* (do Grego *isos* = igual e *topos* = lugar) de um dado elemento existiam, data do início do séc. XX. Após a descoberta da radioatividade e das propriedades periódicas dos elementos químicos as massas de muitos desses elementos constituíam um enigma. Em 1913 Frederick Soddy sugeriu pela primeira vez que diferentes tipos de átomos poderiam ocupar o mesmo lugar na tabela periódica. A demonstração da existência de isótopos estáveis surge no mesmo ano através de J.J. Thompson, que através de uma experiência com tubos de néon pôs em evidência dois dos isótopos deste gás. Em 1919 Francis W. Aston, que trabalhava com Thompson, desenhou e construiu uma sucessão de espectrógrafos de massa melhorando a sua resolução e incorporando campos magnéticos e elétricos que permitiam um aumento da velocidade e foco dos feixes iônicos. Com este instrumento Aston provou que o néon tinha três isótopos e continuou a descobrir a composição isotópica de muitos elementos químicos, pelo que recebeu o Prémio Nobel da Química em 1922 (De Laeter & Kurz, 2006; Fry, 2006).

Em 1932, a descoberta do neutrão mostrou que os isótopos de um elemento têm um número diferente destas partículas sem carga, que têm como função contrabalançar as forças repulsivas entre os prótons no núcleo atômico. Desde então, foram identificados mais de 2000 isótopos, dos quais 272 são estáveis, dos 92 elementos que ocorrem naturalmente (Clark & Fritz, 2013) e só 21 elementos que se sabe terem um só isótopo (Michener & Lajtha, 2008).

Os isótopos podem-se dividir em 2 tipos fundamentais: estáveis e instáveis ou radioativos. Para elementos com baixo número atômico, um isótopo tende a ser estável quando o número de neutrões (N) e o número de prótons (Z) são semelhantes ($N/Z \approx 1$). Para elementos mais pesados, com elevado número de prótons, a repulsão destas partículas com carga positiva aumenta pelo que é necessário um maior número de neutrões para garantir a estabilidade do núcleo (rácio $N/Z \leq 1,5$), caso contrário, a instabilidade do núcleo leva a um decaimento radioativo (Clark & Fritz, 2013; Hoefs, 2009).

A existência na Terra dos diferentes isótopos dos elementos químicos reflete os processos nucleares que ocorreram nas estrelas onde estes foram produzidos. Esta composição isotópica inicial pode variar nos ambientes terrestres ao longo do tempo. Esta variação ocorre essencialmente devido a processos de decaimento radioativo, interações dos raios cósmicos e das atividades antropogénicas tais como o processamento de combustíveis nucleares, acidentes nucleares e testes de armas químicas (Ellam, 2016; Ferreira, 2008), em que um determinado isótopo dá origem a outro com libertação de energia (o que acontece espontaneamente nos elementos radioativos). Deste modo, os isótopos estáveis podem ser radiogénicos (terem origem no decaimento de isótopos radioativos) ou estarem presentes desde a formação da Terra (Le Bot, Oulhote, Deguen & Glorennec, 2011).

Para elementos como o carbono, azoto, enxofre, oxigénio e hidrogénio o isótopo estável mais leve representa cerca de 95% do total, enquanto para outros elementos como o boro e o lítio os isótopos estáveis mais pesados são os mais abundantes, mais de 80% do total. Poucos são os elementos que têm um número aproximadamente igual de isótopos estáveis leves e pesados. O número de isótopos dos elementos é bastante variável, enquanto o estanho tem 10 isótopos, elementos como o flúor e o fósforo possuem apenas um (Fry, 2006).

A primeira medição precisa de rácios isotópicos foi realizada em 1936 por Alfred Nier (o principal responsável para que os espectrógrafos de massa se tornassem em espectr metros de massa). Nier também demonstrou que a composi o isotópica do carbono era variável na natureza e que o rácio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ podia variar até 5%. Posteriormente demonstrou-se que essas varia es no rácio isotópico do carbono eram causadas por rea es químicas que levavam ao fracionamento do ^{12}C do ^{13}C (De Laeter & Kurz, 2006).

As técnicas de medi o das razões de isótopos estáveis utilizaram-se inicialmente como métodos de data o nas ciências geológicas e s  mais tarde se estenderam   biologia e botânica, levando ao desenvolvimento de novas teorias sobre os processos bioquímicos que ocorrem na natureza, com base na medi o da abundância natural dos isótopos estáveis contidos na matéria orgânica das plantas (Ellam, 2016; Ferreira, 2008).

2.2.1 - ABUNDÂNCIA NATURAL DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS

A abundância natural dos isótopos estáveis não é sempre igual ao longo dos ciclos dos elementos na biosfera. Os isótopos distribuem-se na biosfera seguindo um padrão característico e essas diferenças na sua distribui o resultam de diversos fatores, que podem ser fatores externos (geológicos, climáticos e ecológicos) e fatores internos (vias metabólicas, posi o na cadeia alimentar, etc.) (Ferreira, 2008).

Esta varia o nas abundâncias isotópicas baseia-se no fato de que as pequenas diferenças de massa entre os isótopos de um elemento levam a um comportamento diferente dos átomos tanto em processos físicos como em rea es químicas. Estas diferenças devem-se aos efeitos isotópicos que conduzem ao uso preferencial de certos isótopos (como o ^{12}C comparado com o ^{13}C) em muitos processos biológicos e químicos, que é usualmente descrito como discrimina o isotópica, ou fracionamento isotópico, o que na realidade reflete o fato dos isótopos com massas diferentes reagirem de maneira diferente. No geral os isótopos mais leves tendem a formar liga es mais fracas e a reagir mais rapidamente que os isótopos mais pesados, as moléculas que cont m os isótopos mais leves também evaporam e difundem mais rapidamente que as que cont m o isótopo mais pesado. O fracionamento isotópico ocorre quando os isótopos de um elemento se dividem de maneira diferente entre 2 fases ou duas substâncias,

resultando numa concentração desproporcionada de um dos isótopos em relação ao outro em um dos lados de uma reação (Michener & Lajtha, 2008).

O fracionamento isotópico é o processo chave que afeta a abundância relativa dos isótopos estáveis na natureza. O entendimento dos processos que estão por trás do fracionamento e o estudo da distribuição da abundância natural dos isótopos, permite utilizar as razões isotópicas para compreender a atividade de plantas, animais e ecossistemas como um todo (Erkkila et al., 2017).

A circulação dos isótopos na natureza não envolve só o fracionamento. Por exemplo, o carbono de plantas de diversas fontes mistura-se no solo, tal como os predadores que se alimentam de animais com diferentes dietas ou os microrganismos que usam vários substratos. Após esta mistura e remistura quase toda a matéria orgânica é decomposta em moléculas orgânicas mais simples que se acumulam nos grandes reservatórios naturais onde se reinicia a síntese e fracionamento que levam os isótopos a circular na biosfera. É, pois, esta circulação dos elementos e seus isótopos na biosfera e o seu fracionamento e posterior remistura que conduzem a uma distribuição isotópica regular e que define a abundância natural dos isótopos (Fry, 2006).

2.2.1.1 - EFEITOS ISOTÓPICOS

A estrutura eletrônica na zona exterior do átomo controla as reações químicas, pelo que o comportamento químico de dois isótopos, que possuem o mesmo número de elétrons, é qualitativamente semelhante. No entanto as propriedades físicas podem ser alteradas devido às diferenças na massa. Como já referido, os isótopos de um mesmo elemento têm massas diferentes devido ao número distinto de neutrões presentes no núcleo. Às diferenças nas propriedades físicas provocadas pela variação da massa atômica de um elemento chama-se “efeito isotópico” (Hoefs, 2009). Estes efeitos isotópicos traduzem-se em diferenças na velocidade das reações e na força das ligações envolvendo isótopos com massas diferentes. São estes efeitos isotópicos que conduzem ao fracionamento isotópico. Note-se que os efeitos isotópicos são um fenómeno físico que ocorre a nível atómico que levam ao fracionamento isotópico, que é um fenómeno observável e quantificável (Hayes, 2002).

Uma das razões por as diferenças na massa levarem a comportamentos físicos diferentes deve-se ao fato da energia cinética (EC) ser constante para um determinado elemento num mesmo ambiente.

(1)

$$EC = \frac{1}{2} mv^2$$

Considerando a expressão geral para o cálculo da energia cinética (1), em que EC é a Energia Cinética, m é a massa e v a velocidade, e assumindo que moléculas no mesmo ambiente físico (nomeadamente temperatura) têm a mesma energia cinética, então a molécula com massa superior desloca-se a uma velocidade menor (note-se que esta equação é válida para o vácuo, havendo versões mais complexas para a difusão no ar) (Sulzman, 2007).

Outra lei da física que determina o comportamento dos isótopos, define que a energia de uma molécula é controlada pela frequência da sua vibração. Como os átomos mais pesados vibram mais lentamente que os mais leves, a energia da molécula com o isótopo mais pesado é menor e por conseguinte forma ligações mais fortes e mais estáveis (Clark & Fritz, 2013).

Existe assim uma diferença na taxa a que as ligações quebram e esta diferença causa fracionamento isotópico. As ligações formadas com isótopos mais leves são mais “elásticas” e têm uma energia potencial mais elevada, localizando-se numa zona superior do poço de energia (Figura 7). Estas ligações com isótopos leves são mais amplas (maior distância de ligação) pois os átomos vibram mais, precisando de uma quantidade de energia relativamente menor para poderem abandonar o poço de energia potencial levando ao afastamento dos átomos e quebra da ligação.

As características das ligações são diferentes quando envolvem isótopos mais pesados. Estas ligações vibram menos e têm de ganhar uma quantidade de energia maior para saírem do poço de energia até que os átomos se separem e se quebre a ligação. Assim, para uma determinada quantidade de energia adicionada ao sistema, serão mais as ligações com isótopos leves a quebrar relativamente aos isótopos mais pesados e essa diferença na taxa da reação produz o fracionamento isotópico. É também pela mesma razão que uma vez formada, é mais difícil de quebrar esta ligação com um

isótopo mais pesado pois é mais estável e menos energética. Do mesmo modo, numa reação de troca em equilíbrio, os isótopos mais pesados concentram-se no lado da reação onde estão as moléculas em que as ligações são mais fortes (Fry, 2006). Hoefs (2009) e Sharp (2017) descrevem os efeitos da mecânica quântica que originam estas diferenças, nomeadamente como a frequência da vibração dos átomos numa molécula e conseqüentemente a energia necessária para quebrar as ligações está dependente da massa.

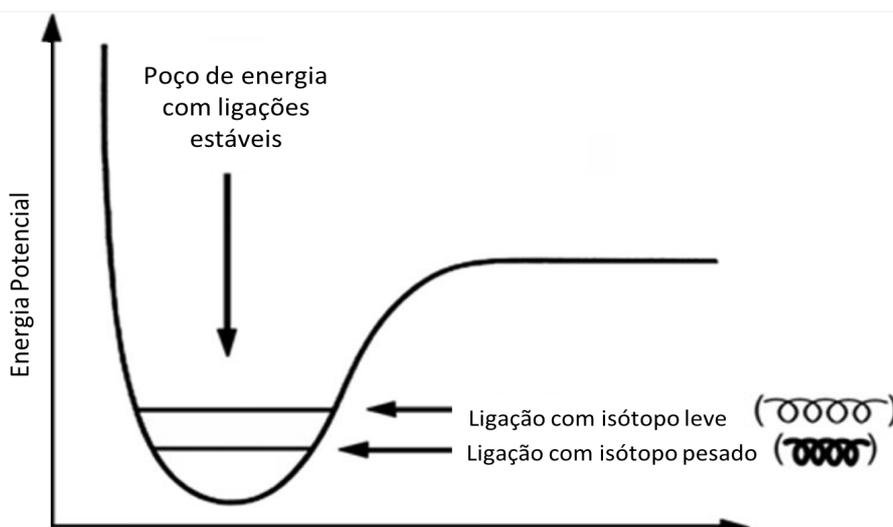


Figura 7 - Poço de Energia Potencial para ligações estáveis com isótopos leves e isótopos pesados (adaptado de Fry, 2006).

São os elementos de baixo peso molecular que exibem as maiores diferenças nas propriedades físicas dos seus isótopos, como é o caso da diferença entre H_2O e 2H_2O . Considerando que o comportamento físico de dois isótopos é quantitativamente diferente, as maiores diferenças ocorrem nos elementos mais leves, onde a diferença de massas é maior, como por exemplo o deutério (2H) que tem o dobro da massa do hidrogénio (1H), enquanto um neutrão extra no ^{33}S representa um acréscimo da massa de apenas 3% relativamente ao ^{32}S (Hoefs, 2009; Sulzman, 2007).

São estas diferenças na velocidade e na força das ligações entre os diferentes isótopos de um elemento que conduzem ao fracionamento, ou seja, diferenças nos isótopos presentes nos compostos em ambos os lados de uma reação (Fry, 2006; Sulzman, 2007).

Tendo em conta estas propriedades, pode-se considerar que existem vários tipos de fracionamento originados por diferentes efeitos isotópicos, podendo-se distinguir principalmente entre os efeitos isotópicos físicos e os efeitos isotópicos químicos. Dentro dos efeitos isotópicos químicos pode ainda considerar-se os efeitos isotópicos cinéticos e efeitos isotópicos termodinâmicos ou de equilíbrio (Ferreira, 2008).

É importante salientar que em processos biológicos complexos nem sempre é possível verificar qual o tipo de fracionamento que está a ocorrer pois os elementos estão envolvidos em vias complexas envolvendo múltiplas reações (Porcelli & Baskaran, 2012).

2.2.1.1.1 - Efeitos isotópicos químicos

Existem 2 regras fundamentais para compreender o processo de fracionamento envolvendo efeitos isotópicos químicos durante uma reação, seja ela química ou bioquímica. A primeira é que quando se formam ou quebram ligações em reações unidirecionais existe uma ligeira diferença na taxa da reação, pois nas reações cinéticas os isótopos mais leves reagem mais rapidamente, as diferenças na massa dos isótopos envolvidos influenciam a velocidade da reação (efeitos isotópicos cinéticos). Além desta regra aplicável a reações unidirecionais com taxas de reação mais ou menos rápidas existe outra regra importante para reações que se processam em ambas as direções que eventualmente atingem uma situação de equilíbrio. Esta segunda regra determina que em reações de troca, os isótopos mais pesados se concentram do lado em que as ligações são mais fortes, ou seja, as diferenças de massa influenciam o estado de energia do sistema (efeitos isotópicos termodinâmicos) (Fry, 2006).

2.2.1.1.1.1 -Efeitos isotópicos cinéticos

Os efeitos isotópicos cinéticos estão relacionados com a velocidade das reações. Estes efeitos isotópicos surgem nas reações unidirecionais (ou irreversíveis), como por exemplo nas reações enzimáticas, ou na evaporação em sistemas abertos (em que o vapor de água se afasta do reservatório de água líquida). Diz-se que um Efeito Isotópico

Cinético ocorre quando a taxa de uma reação química é sensível à massa atômica, em uma determinada posição, de uma das substâncias reagentes (Hayes, 2002). Considerando a energia de ligação dos compostos originais, o fracionamento ocorre quando as ligações são formadas ou quebradas numa reação irreversível em que os isótopos mais leves, que têm forças de ligação mais fracas, reagem mais rapidamente (Sharp, 2017).

Um efeito isotópico cinético pode ocorrer durante as mudanças de fase. Se por exemplo, o vapor de água que se forma acima de uma superfície de um corpo de água, for continuamente transportado devido a processos turbulentos, a reação de mudança de fase não consegue alcançar um equilíbrio, é forçada para um lado da equação da reação (Cappa, 2003).

Outro exemplo de fracionamento provocado por efeitos isotópicos cinéticos é o que ocorre nas reações enzimáticas em processos biológicos em que se utilizam preferencialmente as espécies isotópicas mais leves, devido à mais baixa energia necessária para quebrar as ligações das moléculas, resultando num fracionamento considerável entre o substrato (com predominância do isótopo mais pesado) e o produto (empobrecido no isótopo mais pesado) (Ferreira, 2008).

2.2.1.1.1.2 - Efeitos isotópicos de equilíbrio (ou termodinâmicos)

O fracionamento resultante dos efeitos isotópicos de equilíbrio envolve a redistribuição dos isótopos entre as várias espécies ou diferentes fases, numa situação de equilíbrio, em que a velocidade das reações direta e inversa é igual e as abundâncias isotópicas nos reagentes e produtos mantêm-se constantes, mas geralmente não idênticas.

Os efeitos isotópicos de equilíbrio ou termodinâmicos podem ser considerados em termos do efeito que a massa atômica tem na energia das ligações. Substituir um isótopo leve por um isótopo pesado numa determinada localização numa molécula, não afeta as suas cargas nucleares ou distribuição eletrônica, no entanto afeta a força das ligações (Sharp, 2017). A energia requerida para quebrar uma ligação é ligeiramente mais elevada para um isótopo pesado que para um isótopo leve e esta pequena diferença na força das ligações resulta num fracionamento devido à acumulação do

isótopo mais pesado num dado componente de um sistema em equilíbrio, pois o isótopo pesado irá ligar-se preferencialmente ao composto químico em que este vai ficar mais fortemente ligado. Por exemplo, quando o CO_2 está em equilíbrio com o H_2O e os átomos de oxigénio trocam, o ^{18}O concentra-se na molécula de CO_2 , pois o ^{18}O forma ligações covalentes mais fortes com o C do que o ^{16}O .

Este efeito isotópico também se verifica para o mesmo composto, mas em diferentes fases, como acontece, por exemplo, com a condensação da água nas nuvens. Quando existe equilíbrio entre a fase líquida e a fase de vapor os isótopos mais pesados da água, ^{18}O e ^2H , concentram-se na fase líquida enquanto os isótopos mais leves tendem para a fase de vapor. Por exemplo, a pressão de vapor, ou seja, a pressão que o vapor de água exerce sobre a água líquida em equilíbrio termodinâmico, de $^2\text{H}_2\text{O}$ é aproximadamente 40 torr mais baixa que a de $^1\text{H}_2\text{O}$, pois a pressão de vapor é inversamente proporcional às forças intermoleculares e as ligações entre o ^2H e o O são mais fortes que as ligações com o isótopo mais leve (^1H). Por conseguinte, a evaporação leva a um fracionamento observável produzindo vapor de água mais “leve” e ficando a água líquida enriquecida em ^2H .

A extensão do fracionamento resultante deste efeito isotópico está, no entanto, dependente da temperatura, de modo que as maiores diferenças se verificam a temperaturas mais baixas (Ferreira, 2008; Hayes, 2002; Hoefs, 2009; Sharp, 2017; Sulzman, 2007).

2.2.1.1.2 - Efeitos isotópicos físicos

Alguns autores consideram ainda outros efeitos isotópicos que julgam não encaixar no conceito de reações termodinâmicas ou cinéticas, como por exemplo no caso da difusão. Neste caso, em que os isótopos mais leves, pelo fato de se deslocarem com uma velocidade superior, conduzem a uma separação dos isótopos leves dos pesados. Considera-se este tipo de fracionamento como resultante de um efeito isotópico de origem física, como por exemplo a difusão de H_2O ou CO_2 no ar (Erkkila et al., 2017; Ferreira, 2008; Hoefs, 2009).

2.3 – CIRCULAÇÃO DOS ISÓTOPOS NA BIOSFERA

Os elementos e seus isótopos circulam na natureza com uma distribuição regular e característica, produzida pelos consecutivos fracionamentos e posterior remistura. As quantidades de elementos e isótopos envolvidos na circulação são importantes, com grandes reservatórios que representam pontos de estabilidade na circulação isotópica como um todo. Alguns destes reservatórios encontram-se nos oceanos, incluindo a água oceânica como reservatório dos isótopos de hidrogênio e oxigênio e o carbono inorgânico para os isótopos de carbono. O oceano também é o reservatório para os isótopos de enxofre enquanto o N₂ atmosférico funciona como reservatório no ciclo do azoto. Estes grandes reservatórios têm uma composição isotópica estável (Fry, 2006).

O maior sinal isotópico observável na biosfera para os isótopos de C, N e S ocorre na captação do CO₂ e nutrientes pelas plantas e microrganismos enquanto para os isótopos de H e O os fracionamentos nas reações que envolvem a água são os mais importantes.

2.3.1 - FONTE DE CO₂ - CICLO DO CARBONO

O ciclo do carbono envolve trocas ativas de CO₂ entre a atmosfera, os ecossistemas terrestres e a superfície do oceano (Figura 8). Alguns destes processos, que permitem a troca de carbono entre os diversos reservatórios, envolvem fracionamentos isotópicos levando a que o rácio isotópico nos diferentes reservatórios seja diferente. Os principais reservatórios de carbono são a atmosfera, o oceano, a biosfera e o carbono presente na crosta terrestre, incluindo os sedimentos e os combustíveis fósseis.

Na variação da composição isotópica do carbono, o CO₂ atmosférico representa a maior ligação entre as porções orgânica e inorgânica do ciclo do carbono terrestre e entre os ecossistemas terrestre e marinho. O CO₂ atmosférico participa nas reações de equilíbrio com os carbonatos do oceano e representa a maior fonte de carbono na biosfera como substrato para a fotossíntese.

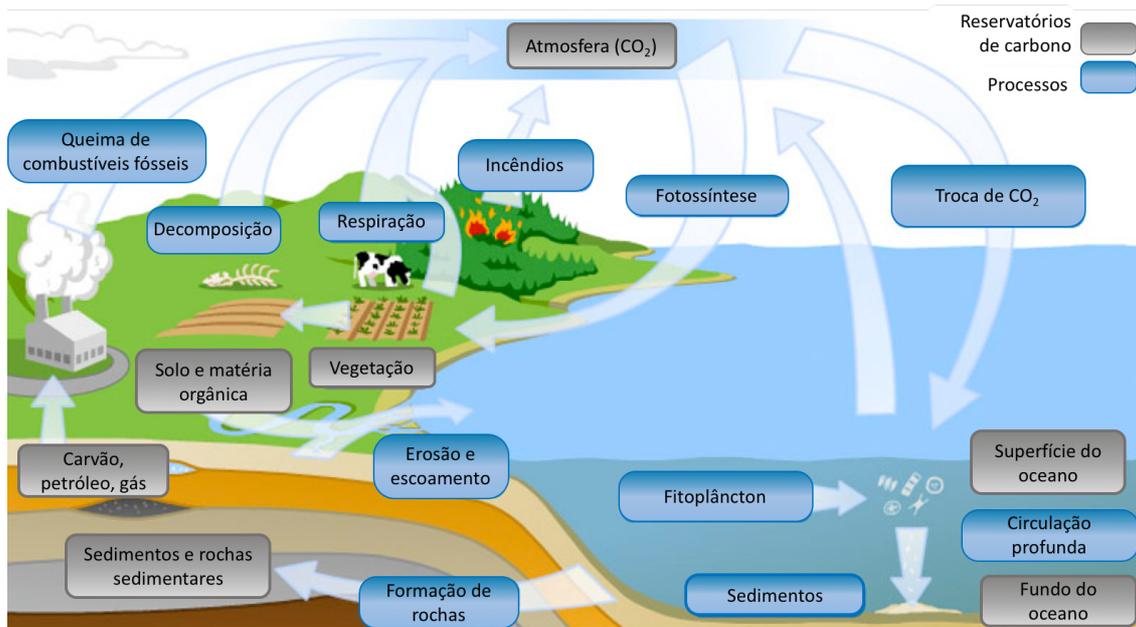


Figura 8 - Ciclo do carbono (adaptado de https://www.sciencelearn.org.nz/image_maps/3-carbon-cycle).

Para além do carbono presente na crosta terrestre, o carbono inorgânico dissolvido nos oceanos é o maior reservatório no ciclo global do carbono, cerca de 50 vezes mais que o carbono presente na atmosfera, pelo que é o carbono contido no oceano que determina o CO₂ atmosférico e não o contrário.

O CO₂ atmosférico está continuamente a estabelecer reações de troca com o CO₂ à superfície do oceano. Esta troca, que chega às 90 gigatoneladas por ano em ambas as direções, leva a um equilíbrio entre a atmosfera e a superfície da água (Falkowski et al., 2000). Por outro lado, o CO₂ também se dissolve na água formando HCO₃⁻, contribuindo assim para o total de carbono inorgânico dissolvido no oceano.

O rácio isotópico do total de carbono inorgânico dissolvido e dos carbonatos marinhos é de aproximadamente 0‰ (relativamente ao padrão internacional VPDB, que também é um carbonato de origem marinha) (Brugnoli & Farquhar, 2000). Uma vez que o oceano, em particular o seu carbono inorgânico dissolvido, é um reservatório muito maior que a atmosfera, o rácio isotópico do CO₂ atmosférico é, em grande parte, determinado pelas trocas entre o oceano e a atmosfera juntamente com o fracionamento durante a troca de CO₂ atmosférico com a biosfera terrestre através da fotossíntese e respiração.

Presentemente a composição isotópica do CO₂ atmosférico é aproximadamente -8‰ com ligeiras variações dependendo da localização e da época do ano. A variação

sazonal é atribuída à variação no balanço entre a fotossíntese e a respiração, enquanto a latitude afeta a composição isotópica pelo fato de a sazonalidade ser menos marcada na zona dos trópicos. Podem ainda ocorrer variações isotópicas relevantes consoante a proximidade com zonas com elevada produção industrial. Verifica-se ainda um empobrecimento em ^{13}C continuamente ao longo do tempo devido ao aumento de CO_2 antropogénico com origem na queima de combustíveis fósseis (-28‰) e desflorestação (Brugnoli & Farquhar, 2000; Fry, 2006).

A troca de CO_2 entre a superfície do oceano e a atmosfera envolve um fracionamento químico de equilíbrio entre o CO_2 atmosférico (-8‰) e o CO_2 total na superfície dos oceanos (1‰). A remoção de carbono para formar carbonatos envolve um pequeno fracionamento isotópico, enquanto a captação do carbono inorgânico dissolvido, para a fotossíntese no plâncton implica um fracionamento cinético considerável tornando o carbono orgânico presente nos oceanos bastante empobrecido em ^{13}C , com valores entre -24‰ e -19‰ aproximadamente.

Nos reservatórios de água doce, o fracionamento é ainda mais expressivo, dependendo da fonte do CO_2 dissolvido, que inclui a erosão das rochas sedimentares, fontes termais, CO_2 atmosférico e proveniente da respiração na matéria orgânica, sendo estas reações responsáveis por um fracionamento considerável com valores de carbono inorgânico dissolvido próximos dos -20‰, que posteriormente fracionado pela fixação de carbono nas algas pode ser aproximadamente -45‰ (Figura 9).

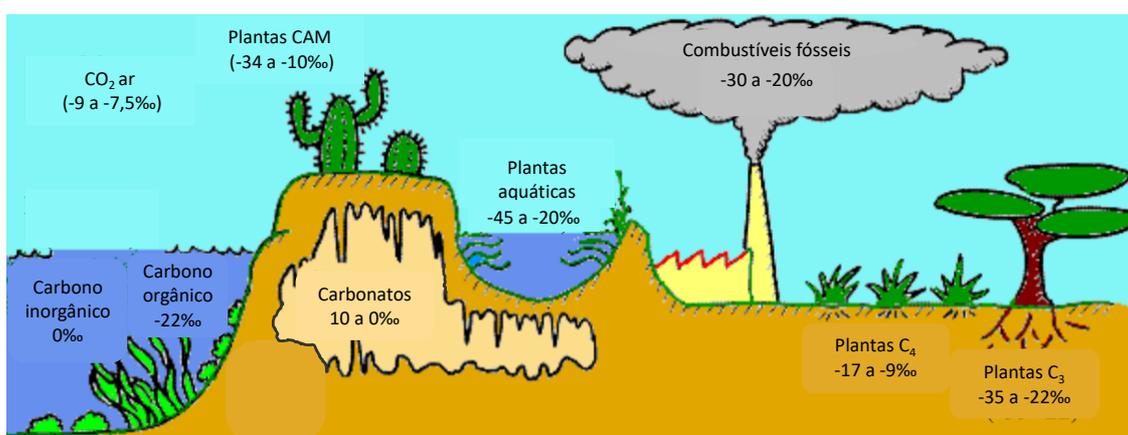


Figura 9 - Variação da composição isotópica $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no meio ambiente (adaptado de Ana Ferreira, 2008).

Os ecossistemas terrestres também trocam CO_2 com a atmosfera. A fotossíntese retira carbono da atmosfera e armazena-o na forma de matéria orgânica. Este carbono

é devolvido à atmosfera por diversas vias, seja através da respiração autotrófica das próprias plantas, seja através da respiração heterotrófica em que a matéria orgânica derivada das plantas é oxidada. A matéria orgânica do solo contém várias vezes mais carbono que a atmosfera ou a biomassa vegetal e o seu rácio isotópico é semelhante, ou ligeiramente enriquecido, à matéria vegetal circundante (Fry, 2006).

2.3.1.1 - FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DO CARBONO POR AÇÃO DAS PLANTAS

As plantas contêm menos ^{13}C que a atmosfera devido aos processos físicos e químicos envolvidos na captação de CO_2 que discriminam relativamente ao ^{13}C . O primeiro aspeto a considerar é que a difusão do $^{13}\text{CO}_2$ é mais lenta que a do $^{12}\text{CO}_2$, relacionada com a diferença da massa. Outro aspeto reside na discriminação que ocorre porque o ^{13}C forma ligações químicas ligeiramente mais fortes que o ^{12}C (O'Leary, 1988). No entanto, o aspeto mais evidente em relação ao $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas está relacionado com a via fotossintética utilizada para a fixação do carbono (O'Leary, 1981).

2.3.1.1.1 - Fotossíntese

A fotossíntese converte o CO_2 em hidratos de carbono, componentes essenciais na composição do material vegetal. Considera-se que a fotossíntese tem 2 passos fundamentais relevantes para a composição isotópica das plantas. 1) A difusão do CO_2 para a folha a partir da atmosfera e 2) A fixação do CO_2 em hidratos de carbono. A discriminação isotópica em relação ao ^{13}C ocorre em ambos os passos.

No primeiro passo o CO_2 entra nas folhas, por difusão, através de poros ajustáveis na superfície da folha chamados estomas. Devido ao fracionamento decorrente da difusão, em que o $^{13}\text{CO}_2$ se difunde mais lentamente no ar, o CO_2 na zona exterior da folha é ligeiramente enriquecido em $^{13}\text{CO}_2$ relativamente ao que se encontra no interior. O valor da discriminação do ^{13}C para a difusão do CO_2 no ar é de 4,4‰.

No segundo passo ocorre a carboxilação, que apresenta diferenças para as 3 vias principais da fotossíntese que ocorrem nas plantas, nomeadamente as vias em C_3 , C_4 e CAM.

A via mais comum é denominada C_3 pois a molécula intermediária no processo tem 3 carbonos. Nas plantas C_3 (onde se inclui a oliveira) o CO_2 liga-se à enzima RuBisCO (*ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxidase*) num sistema bioquímico conhecido como Ciclo de Calvin, através do qual as plantas sintetizam açúcares a partir de CO_2 e H_2O . Podem assim usar o CO_2 como única fonte de carbono, necessário para a biossíntese de celulose, amido, lípidos, proteínas e outros compostos orgânicos.

A fotossíntese tem 2 processos fundamentais: as reações dependentes da luz, em que a clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, localizados nos cloroplastos, convertem a energia luminosa em ATP e NADPH e as reações não dependentes da luz, que utilizam o ATP e NADPH produzidos anteriormente, como agente redutores do CO_2 para a produção de trioses-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato), num processo denominado fixação do carbono. Os açúcares produzidos nesta fase podem ser utilizados para a respiração celular ou para a produção de outros metabolitos necessários ao funcionamento celular (Nelson et al., 2008) (Figura 10).

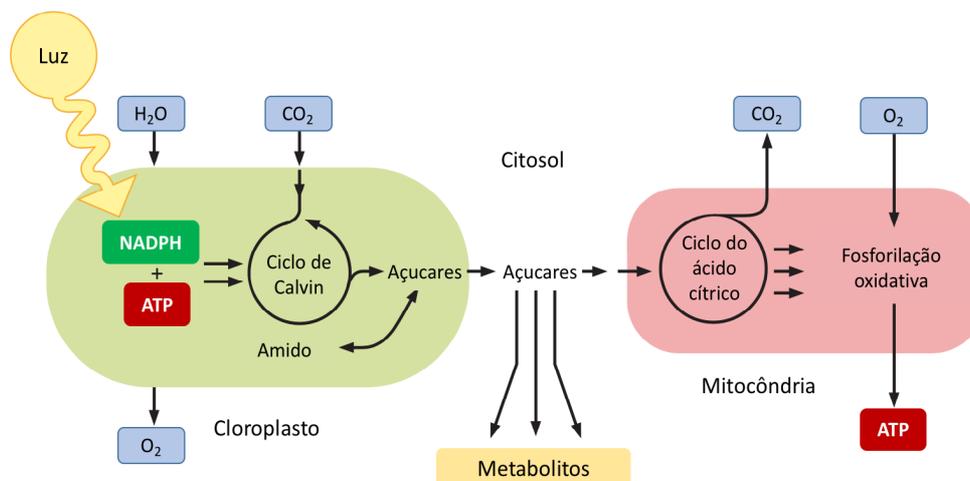


Figura 10 - Fornecimento à célula vegetal de metabolitos e ATP a partir da luz, CO_2 e H_2O . (adaptado de Alberts et al., 2013)

Durante o processo da fixação do carbono, o CO_2 da atmosfera liga-se a um hidrato de carbono (ribulose-1,5-bifosfato) que vai originar 2 moléculas de 3-fosfoglicerato. Esta reação da fixação do carbono acontece no estroma dos cloroplastos por ação de uma enzima de grandes dimensões, denominada *ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxigenase*, ou *RuBisCO*. A *RuBisCO* trabalha mais lentamente que a maioria das outras

enzimas. Processa 3 moléculas de substrato por segundo, em comparação com as 1000 moléculas por segundo de uma enzima típica. Para compensar esta atuação tão lenta, as plantas mantêm um fornecimento constante de *RuBisCO* para assegurar a produção de açúcares de modo eficiente. Esta enzima representa aproximadamente 50% do conteúdo proteico dos cloroplastos, considerando-se a proteína mais abundante no planeta (Alberts et al., 2013).

À série de reações nas quais o CO_2 se combina com a ribulose-1,5-bifosfato para formar gliceraldeído-3-fosfato (a partir do qual se sintetizam outros compostos fundamentais) chama-se Ciclo de Calvin (Figura 11). O gliceraldeído-3-fosfato produzido por este ciclo, no estroma dos cloroplastos, pode ser utilizado de diversas formas consoante as necessidades da planta.

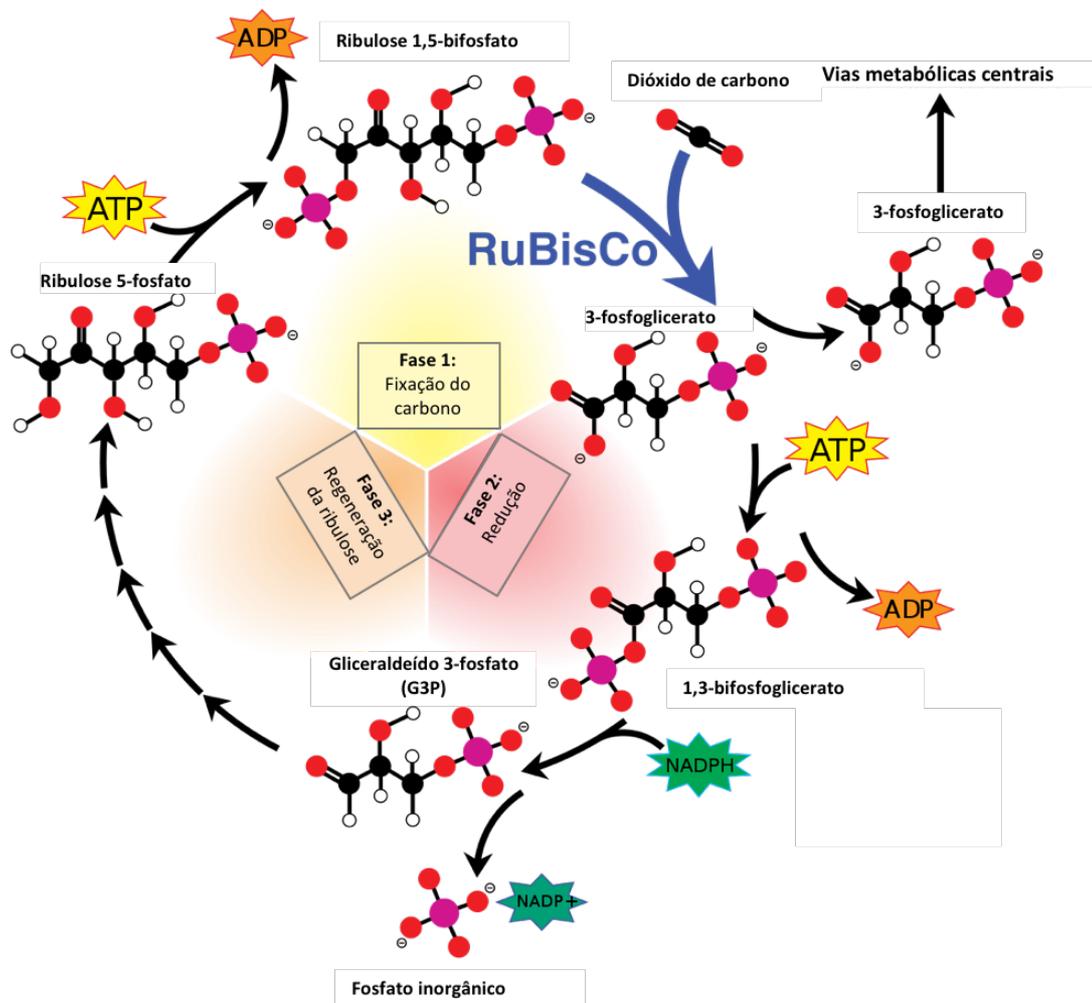


Figura 11 - Ciclo de Calvin (adaptado de Mike Jones , CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9504547>)

Por cada 3 voltas no ciclo de Calvin é gerada uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato a partir de 3 moléculas de CO₂. Esta triose-fosfato pode ser utilizada na síntese de diversos compostos orgânicos. Porém, pode também reentrar no ciclo para formar mais ribulose-1,5-bifosfato, permitindo que o ciclo recomece (pelo que este é um ciclo autocatalítico). Por cada 12 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (36 átomos de carbono), 10 são regeneradas em 6 moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (30 átomos de carbono), o aceitador de CO₂. Os restantes 6 átomos de carbono são convertidos em glucose (usada na produção de sacarose ou amido) ou seguem para a biossíntese de lípidos (Campos, 2005).

Na ausência de luz, as concentrações de ATP e NADPH diminuem, pelo que as plantas necessitam de recorrer à respiração mitocondrial, onde oxidam substratos a CO₂ com consumo de O₂. Existe um processo nas plantas, que tal como na respiração mitocondrial, consome O₂ e produz CO₂ e, tal como a fotossíntese, é induzido pela luz. Este processo é a fotorrespiração e é um custo elevado a pagar pela fotossíntese em resultado da falta de especificidade da enzima *RuBisCO* (não confundir a fotorrespiração

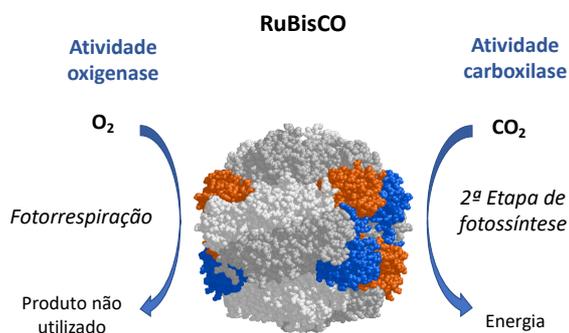


Figura 12 - Atividade carboxilase e oxidase da RuBisCO

com a respiração mitocondrial). Isto porque esta enzima não é específica para fixar CO₂, o O₂ também compete pelo mesmo centro ativo, o que acontece em cada 3 ou 4 voltas do ciclo. Esta é a atividade oxigenase da *RuBisCO*, que resulta numa perda de energia significativa (Figura 12).

Esta atividade é influenciada pela temperatura, que afeta a solubilidade do O₂ e do CO₂. A altas temperaturas o rácio de O₂ para CO₂ aumenta, fazendo diminuir a afinidade da *RuBisCO* com o CO₂. Nestas condições, à medida que o CO₂ é consumido, o rácio de O₂ para CO₂ no interior das folhas vai aumentando (Nelson et al., 2008).

Algumas plantas originárias de zonas tropicais, desenvolveram um mecanismo para diminuir o problema do desperdício de recursos da fotorrespiração. A fixação do CO₂ em 3-fosfoglicerato é precedida de vários passos num dos quais o CO₂ se fixa temporariamente num composto com 4 carbonos (oxaloacetato), daí o nome de plantas em C₄ e o processo de assimilação de via C₄ (ou ciclo de Hatch-Slack) (Figura 13) em

alternativa às plantas em C₃, descritas anteriormente, que fixam o CO₂ num composto com 3 carbonos.

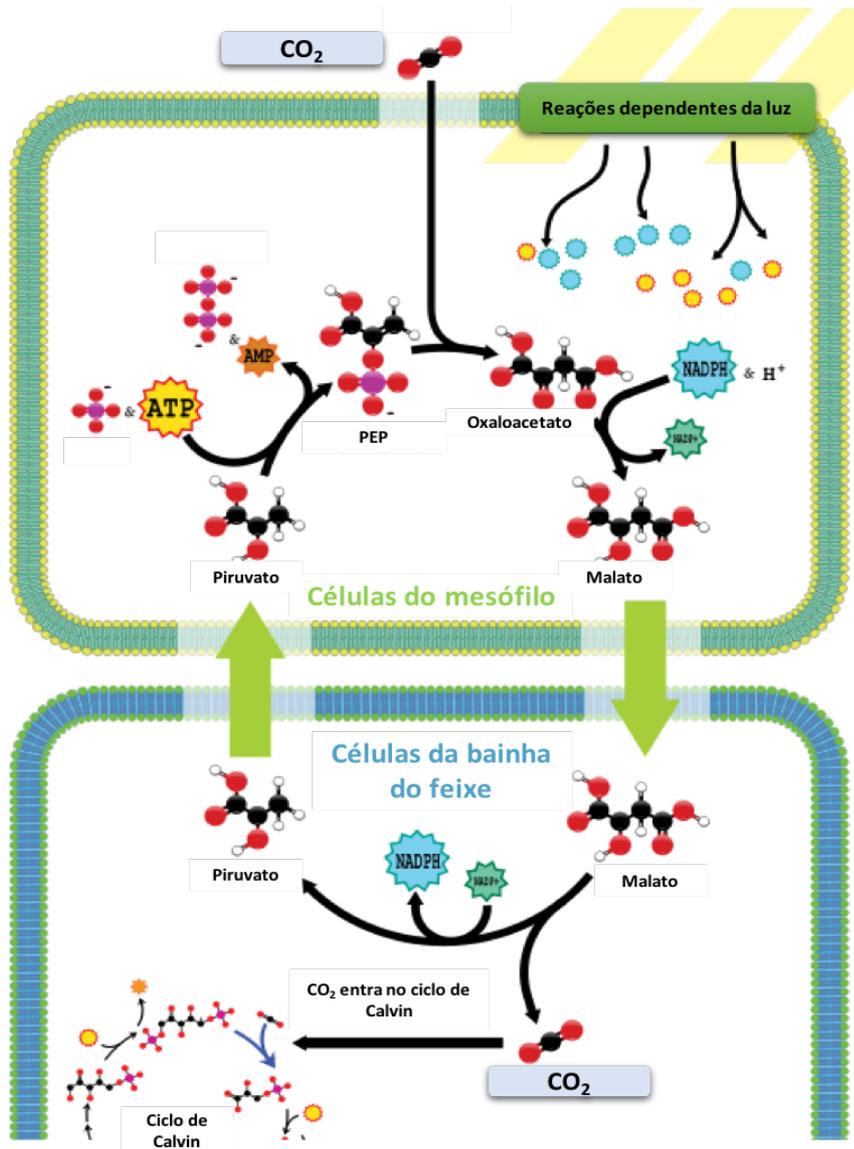


Figure 13 - Esquema da fotossíntese das plantas tipo C₄, com a separação no tempo e no espaço da fixação do CO₂ e da síntese dos hidratos de carbono (adaptado de <http://bio1510.biology.gatech.edu/module-3-molecules-membranes-and-metabolism/10-c4-plants/>)

A fotossíntese em C₄ implica dois tipos de células especializadas: as células do mesófilo e as células da bainha do feixe vascular (Figura 14). A fixação do CO₂ ocorre no citosol das células do mesófilo, catalisada pela *fosfoenolpiruvato-carboxilase* (*PEP-carboxilase*), que utiliza o HCO₃⁻ como substrato e não o CO₂, o oxaloacetato é reduzido

a malato às custas de NADPH. O malato passa para as células da bainha do feixe vascular onde é oxidado e descarboxilado originando CO_2 , que entra para o ciclo de Calvin, e piruvato que é transferido novamente para as células do mesófilo onde é fosforilado a fosfoenolpiruvato, reiniciando o ciclo (Figura 13).

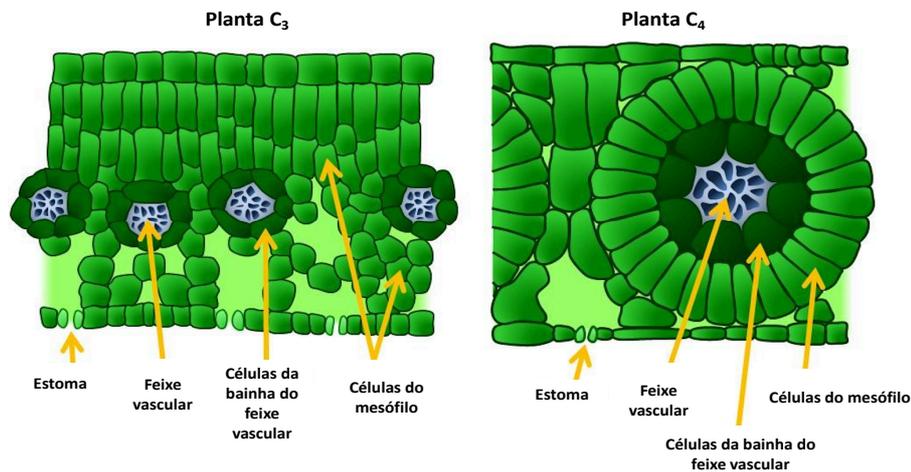


Figura 14 - Fisiologia do tecido foliar em plantas C₃ e C₄ (adaptado de <https://www.jobilize.com/online/course/photosynthetic-pathways-photosynthesis-global-climate-by-openstax?page=1>)

A *PEP-carboxilase* é a enzima principal desta via e tem uma grande afinidade por HCO_3^- (que é favorecido relativamente ao CO_2 em solução aquosa) conseguindo fixar CO_2 mais eficientemente que a *RuBisCO*. Ao contrário da *RuBisCO*, não utiliza O_2 como substrato alternativo, não havendo competição entre CO_2 e O_2 como acontece nas plantas em C₃. A reação com a *PEP-carboxilase* vai fixar, mas também concentrar o CO_2 , o que permite que a *RuBisCO* funcione perto da sua capacidade máxima (Campos, 2005; Nelson et al., 2008; Voet, Voet & Pratt, 2013). É importante salientar que a *RuBisCO* e a *PEP-carboxilase* não são exclusivas das vias fotossintéticas C₃ e C₄ respetivamente. Na realidade as plantas em C₃ também possuem *PEP-carboxilase*, em maior ou menor quantidade, podendo a extensão da sua participação, influenciar o valor isotópico do total do carbono fixado (Brugnoli & Farquhar, 2000; Hayes, 2001).

Existe ainda uma terceira via fotossintética que ocorre nas plantas crassuláceas (plantas suculentas como os catos ou o ananás), denominada CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Estas plantas estão adaptadas a climas muito quentes e secos, reduzem a perda de água pelos estomas, pois além de compartimentalizarem as reações para a

fixação do CO₂ (como fazem as plantas em C₄) também as separam no tempo. Durante a noite, com temperaturas mais baixas e mais humidade no ar, os estomas abrem para permitir a entrada de CO₂ que é fixado no oxaloacetato através da *PEP-carboxilase*. O oxaloacetato é reduzido a malato e armazenado nos vacúolos durante a noite. Durante o dia, os estomas fecham para prevenir a perda de água e o malato armazenado durante a noite sai do vacúolo e a sua descarboxilação gera uma pressão parcial de CO₂ intercelular que permite que o CO₂ seja novamente fixado pela *RuBisCO* (Nelson et al., 2008; von Caemmerer & Quick, 2000).

A importância da diferença entre vias fotossintéticas na autenticação do azeite, deve-se ao fato de a oliveira ser uma planta em C₃ cujas características a permitem distinguir de outras plantas produtoras de óleos vegetais, mas que fixam o CO₂ pela via em C₄. Esta diferença permite identificar situações fraudulentas em que o azeite possa ser misturado com produtos de qualidade inferior.

Como já referido, a oliveira é uma planta em C₃, no entanto a oliveira tem uma particularidade, pois a azeitona é um fruto que durante o seu desenvolvimento possui cloroplastos ativos, que lhe permitem fixar CO₂, pelo que os frutos durante esta fase têm 2 fontes de carbono reduzido. Por um lado, têm os compostos fotossintéticos produzidos nas folhas, por outro lado têm também carbono proveniente do próprio fruto devido à sua capacidade fotossintética de fixar CO₂.

A azeitona permanece verde durante um período de tempo considerável e mantém os cloroplastos ativos durante a maturação. Enquanto a clorofila está localizada principalmente no exocarpo, o mesocarpo contém quantidades significativas de *PEP-carboxilase*, a enzima utilizada na via fotossintética C₄. Durante o período de desenvolvimento e devido, por um lado, à respiração mitocondrial dos produtos da fotossíntese importados das folhas e, por outro lado, à impermeabilidade da cutícula, o CO₂ acumula-se em quantidades consideráveis nos espaços livres entre as células. Com um equilíbrio entre o CO₂ e o HCO₃⁻, a *PEP-carboxilase* presente no citosol catalisa a fixação do carbono no oxaloacetato que se converte em malato (como sucede na via C₄), que posteriormente origina piruvato (precursor na biossíntese dos ácidos gordos) e CO₂ que será fixado pela *RuBisCO* no ciclo de Calvin (Salas, Harwood & Martínez-Force, 2013).

2.3.1.1.2 - FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DO CARBONO NA FOTOSÍNTESE

Durante a fixação do CO_2 na fotossíntese ocorre fracionamento dos isótopos estáveis de carbono e conseqüentemente as plantas são empobrecidas em ^{13}C . Esta discriminação isotópica depende do fracionamento durante a difusão, dissolução e durante as reações enzimáticas de carboxilação (Brugnoli & Farquhar, 2000).

A fonte de ^{13}C das plantas é o $^{13}\text{CO}_2$ atmosférico, no entanto na composição isotópica das plantas verifica-se um empobrecimento em relação à fonte devido ao fracionamento isotópico que ocorre durante a difusão do CO_2 no ar e ao fracionamento substancial associado às reações enzimáticas que catalisam a carboxilação e a descarboxilação durante a fotossíntese. Vários efeitos isotópicos físicos e químicos (cinéticos e de equilíbrio) estão envolvidos. Os efeitos isotópicos cinéticos associados às carboxilações podem ser extensos dependendo da enzima envolvida, ou seja, da via fotossintética usada. Na realidade, a maior variação na composição isotópica das plantas ocorre com diferentes vias fotossintéticas com diferenças entre 14 a 15‰ entre plantas C_3 e C_4 . Esta grande diferença deve-se ao fato da *RuBisCO* e a *PEP-carboxilase*, as principais enzimas envolvidas na carboxilação nas plantas C_3 e C_4 respectivamente, mostrarem diferentes efeitos isotópicos cinéticos intrínsecos. Além do mais, enquanto o substrato para a *RuBisCO* é o CO_2 gasoso, para a *PEP-carboxilase* é o HCO_3^- . As plantas tipo CAM apresentam um metabolismo com uma maior variedade na composição isotópica dependendo da proporção de carbono fixado pela via C_3 durante o dia.

Em termos quantitativos, a difusão do CO_2 através dos estomas e a posterior dissolução na fração aquosa do mesófilo, produz um fracionamento de 4‰ e 0,7‰ respectivamente. O segundo passo no fracionamento, a carboxilação levada a cabo pela *RuBisCO*, é muito mais evidente, cerca de 29‰, devido à elevada afinidade desta enzima pelo $^{12}\text{CO}_2$ em comparação com o $^{13}\text{CO}_2$. Os fracionamentos durante a fotossíntese não são estritamente aditivos, são antes, dependentes da taxa de reação dos passos limitantes. A carboxilação feita pela *RuBisCO* é o passo limitante na fotossíntese em C_3 , pelo que o material vegetal destas plantas sofre um empobrecimento mais acentuado do isótopo pesado de carbono relativamente ao ^{13}C do CO_2 atmosférico ($\delta^{13}\text{C} = -8\text{‰}$). No entanto, esta depleção em ^{13}C é variável ($\delta^{13}\text{C}$ entre -34 e -22‰, para as plantas em

C₃), apesar de se conhecer os valores do fracionamento da difusão, dissolução e da ação da *RuBisCO*. Esta variação é influenciada, em parte, pela abertura e fecho dos estomas.

Podem-se considerar duas situações limite. Na primeira, em que os estomas se encontram praticamente fechados, a taxa da captação do CO₂ geral é limitada pela difusão inicial e a concentração interna de CO₂ é baixa. Nesta situação o processo da carboxilação usa virtualmente todo o carbono disponível e o fracionamento associado à carboxilação não se expressa. Assim, espera-se um fracionamento aproximado ao da difusão (4,4‰) o que originaria material vegetal com δ¹³C de -12,4‰ (considerando que o valor inicial do CO₂ atmosférico é de -8‰).

Numa segunda situação, em que os estomas se encontrem relativamente abertos, a concentração do CO₂ no interior da folha é semelhante à concentração no exterior, havendo uma troca constante entre os dois. Neste caso o fracionamento associado à difusão para o interior da folha não é expresso, o fracionamento aproxima-se do observado para a carboxilação. O δ¹³C do material vegetal seria aproximadamente -38‰ (considerando o valor do CO₂ atmosférico, o fracionamento da dissolução e o fracionamento da carboxilação). Na realidade, as plantas apresentam um comportamento intermédio entre estas situações extremas (Marshall, Brooks & Lajtha, 2007; O'Leary, 1988; O'Leary, 1993).

Um modelo matemático detalhado, que descreve a discriminação isotópica do carbono nas plantas, foi apresentado por Farquhar, O'Leary e Berry (1982). Neste modelo, os autores dividem o fracionamento durante o percurso efetuado pelo CO₂ em 4 locais distintos: camada limite nas folhas, estomas, transferência dos estomas para o cloroplasto e cloroplasto, em que a discriminação isotópica do carbono é dada por:

$$(2) \quad \Delta = a_b \frac{P_a - P_i}{P_a} + a \frac{P_s - P_i}{P_a} + (e_s + a_1) \frac{P_i - P_c}{P_a} + b \frac{P_c}{P_a} - \frac{\frac{eR_d}{k} + f\Gamma^*}{P_a}$$

Em que P_a , P_s , P_i e P_c são as pressões parciais do CO₂ na atmosfera livre, na superfície da folha, nos espaços intercelulares antes de entrar em solução e nos locais da carboxilação respetivamente; a_b é a discriminação que ocorre na difusão na camada limite (2,9‰); a é o fracionamento que ocorre durante a difusão no ar (4,4‰); e_s é o fracionamento da dissolução do CO₂ em solução (1,1‰); a_1 é o fracionamento que

ocorre na fase líquida (0,7‰); b é a sequência de discriminações que se verifica durante a carboxilação nas plantas C_3 ; e e f são os fracionamentos que podem ocorrer durante a respiração (R_d - fase não dependente da luz da fotossíntese) e fotorrespiração respectivamente; k é a eficiência da carboxilação e Γ^* é o ponto de compensação de CO_2 na ausência da respiração (R_d).

O valor de b neste modelo não é simplesmente o valor da discriminação associada à carboxilação efetuada pela *RuBisCO*, porque mesmo nas plantas em C_3 uma proporção variável do carbono é fixado pela *PEP-carboxilase* e eventualmente, por outras carboxilases que não a *RuBisCO*, que atuam em paralelo afetando a composição isotópica no geral do carbono fixado. O valor de b contabiliza a participação das diferentes carboxilases que podem intervir.

Existem outras fontes de incerteza na determinação do fracionamento do carbono durante a fotossíntese, nomeadamente nos processos relativos à respiração e fotorrespiração, os termos e e f na equação (2), no entanto, estes parecem ter um efeito pouco significativo. Já o rácio P_i/P_a está linearmente correlacionado com a discriminação do ^{13}C nas plantas em C_3 , ou seja, quando o P_i/P_a é pequeno a discriminação isotópica é dominada pelo fracionamento da difusão (4,4‰), quando o rácio P_i/P_a é grande, a discriminação é dominada pela carboxilação (29‰). É importante salientar que o que determina o rácio P_i/P_a é o balanço entre a capacidade fotossintética e a condutância estomatal (Brugnoli & Farquhar, 2000).

Relativamente às plantas em C_4 , a discriminação durante a fotossíntese é menos evidente. Note-se que a fotossíntese em C_3 ocorre num sistema relativamente aberto (Fry, 2006) e o CO_2 enriquecido em ^{13}C no interior das folhas, na sequência da ação da *RuBisCO*, pode difundir para o exterior. Por outro lado, na fotossíntese em C_4 , a principal enzima na fixação do carbono é a *PEP-carboxilase* e só depois dos compostos C_4 formados passarem para as células da bainha do feixe vascular é que a ação da *RuBisCO* ocorre, neste caso, num sistema parcialmente fechado, em que o CO_2 enriquecido em ^{13}C não é difundido para a atmosfera, pelo que é utilizado numa extensão maior (Gannes et al., 1998).

Os fracionamentos envolvidos nas reações bioquímicas estão muito dependentes se este se dá em sistemas parcialmente fechados ou abertos, ou seja, se existe um fornecimento contínuo dos compostos necessários à reação. Neste caso, o

fracionamento originado pelas reações enzimáticas é mais evidente do que quando se trata de um sistema fechado em que os reagentes são consumidos na totalidade, não havendo por isso, evidências do potencial fracionamento associado à reação.

2.3.1.2 - METABOLISMO LIPÍDICO E BIOSÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

A síntese *de novo* de dos ácidos gordos ocorre nos cloroplastos e tem como precursor o acetil-CoA. A sua biossíntese é feita a partir do piruvato (Figura 15), que pode ter 3 origens diferentes: 1) o piruvato é formado a partir da via glicolítica que após a descarboxilação oxidativa origina acetil-CoA e CO₂ (reação que envolve um complexo enzimático denominado *piruvato-desidrogenase*); 2) a síntese do piruvato é feita a partir da descarboxilação do malato; 3) o acetil-CoA é obtido a partir do piruvato na mitocôndria, onde é hidrolisado a acetato. Este deixa a mitocôndria e alcança o cloroplasto onde é ativado a acetil-CoA pela *acetil-CoA-sintetase* (Salas et al., 2013).

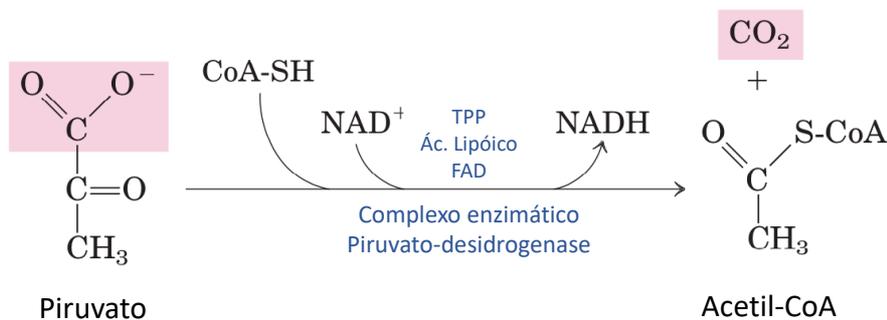


Figura 15 - Descarboxilação do piruvato a acetil-CoA (adaptado de Nelson, Lehninger, and Cox, 2008).

A síntese de novo de ácidos gordos necessita da ação combinada de 2 complexos enzimáticos, a *acetil-CoA-carboxilase* (Figura 16) e a *sintase de ácidos gordos* (Figura 17). O complexo enzimático *acetil-CoA-carboxilase* é uma proteína multifuncional com três domínios diferentes: a *biotina-carboxilase*, a *carboxil-transferase* e a proteína transportadora de biotina. A *acetil-CoA-carboxilase* catalisa a formação de malonil-CoA a partir do CO₂ e da co-enzima biotina. Inicialmente um grupo carboxilo derivado do HCO₃⁻ é transferido para a biotina, numa reação dependente de ATP. A biotina é

carboxilada pela biotina-carboxilase e o CO₂ é transferido para o acetil-CoA pela carboxil-transferase.

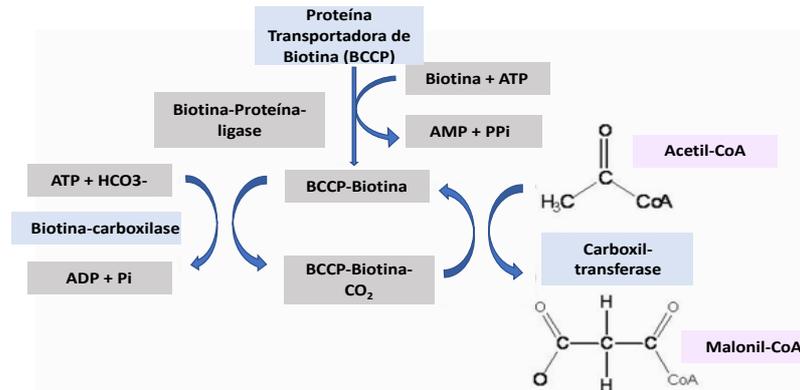


Figura 16 - Ação do complexo enzimático *acetil-CoA-carboxilase*

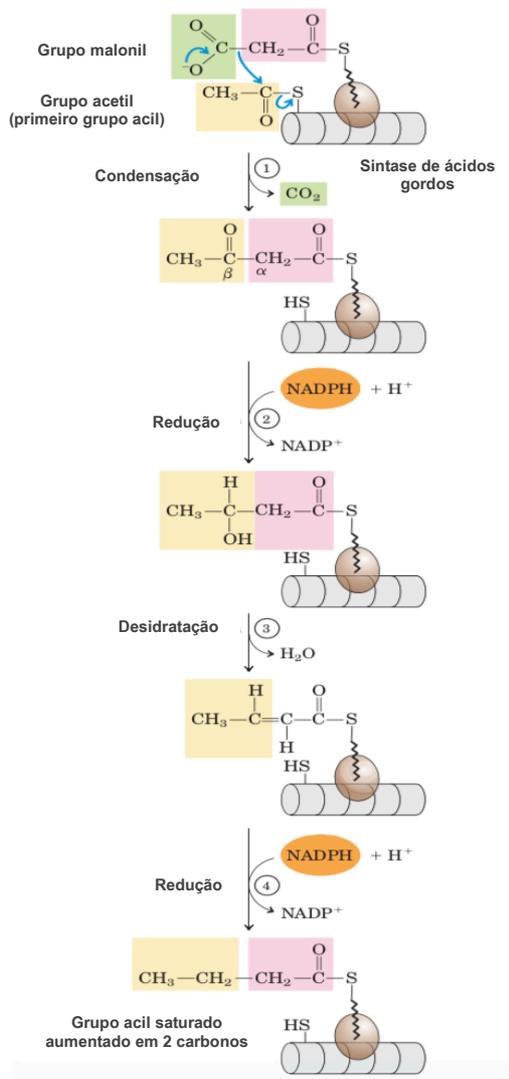


Figura 17 – Sequência da adição de carbonos no alongamento dos ácidos gordos (adaptado de Nelson et al., 2008).

A síntese das cadeias de ácidos gordos resulta de um processo de alongamento em que os grupos acilo do acetil-CoA e do malonil-CoA são transferidos por *uma acetil-transferase* e *uma malonil-transferase* respetivamente, para uma proteína denominada Proteína Transportadora de Acilo (ACP). O acetil-ACP e o malonil-ACP reagem então para formar o acetoacetil-ACP numa reação de condensação catalisada por uma enzima condensadora. O acetoacetil-ACP entra numa série de reações catalisadas pelo complexo enzimático sintase de ácidos gordos (que inclui seis enzimas assim como a ACP) originando o butiril-ACP. O butiril-ACP reage com uma nova molécula de malonil-ACP e a cada sequência de reações a cadeia do ácido gordo é alongada em 2 carbonos pela adição de malonil-ACP, sendo o produto final o palmitil-ACP (16:0) ou o estearil-ACP (18:0). Este último alongamento é importante para definir o rácio C₁₆/C₁₈ de ácidos gordos no fruto.

É na cadeia de 18 carbonos (estearil-ACP) que pode ser introduzida, através de uma dessaturase, uma dupla ligação entre o C-9 e C-10, para formar oleil-ACP, que pode ser transportado para o retículo endoplasmático para posteriores transformações. Estas transformações, catalisadas por dessaturases, dão origem aos ácidos gordos insaturados presentes no azeite, tal como o ácido oleico (18:1), o ácido linoleico (18:2) e o ácido linolénico (18:3) (Campos, 2005; Nelson et al., 2008; Salas et al., 2013).

Os triacilgliceróis são formados pela reação de 2 grupos acilo-CoA em 2 ácidos gordos com o glicerol-3-fosfato, para formar ácido fosfatídico. Este produto é posteriormente desfosforilado a di-acilglicerol, que irá reagir com um terceiro ácido gordo e produzir um triacilglicerol.

2.3.1.2.1 - Fracionamento isotópico do carbono na biossíntese de triacilgliceróis

A discriminação isotópica do carbono nos diferentes compostos e metabolitos das plantas, em comparação com os valores de $\delta^{13}\text{C}$ observados nas análises em *bulk* podem ser consideráveis. Uma das maiores diferenças observáveis é respeitante aos lípidos, que são significativamente empobrecidos (-5 a -10‰) relativamente ao $\delta^{13}\text{C}$ total da planta. Esta depleção em ^{13}C nos ácidos gordos e lípidos em geral, pode estar relacionada com fracionamentos secundários associados à descarboxilação do ácido pirúvico pela *piruvato-desidrogenase* (Brugnoli & Farquhar, 2000; Hayes, 2001; O'Leary, 1981; O'Leary, 1988). A *piruvato-desidrogenase* é um complexo enzimático (Figura 15) que oxida mais rapidamente o piruvato com um grupo carbonilo com ^{12}C do que o piruvato com ^{13}C . Esta oxidação produz acetil-CoA empobrecido em ^{13}C comparativamente à fonte de piruvato (Gannes et al., 1998; Melzer & Schmidt, 1987).

2.3.2 - FONTE DE HIDROGÉNIO E OXIGÉNIO – CICLO HIDROLÓGICO

A determinação das razões isotópicas de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ na avaliação da autenticidade e origem geográfica de produtos alimentares é particularmente interessante uma vez que a fonte do hidrogénio e oxigénio orgânicos é a hidrosfera. A água meteórica (termo utilizado para designar a água da chuva) que passou pelo ciclo meteorológico da

evaporação, condensação e precipitação “acaba” por constituir a água subterrânea captada pelas plantas (Perri, Benincasa & Muzzalupo, 2012). A relevância da determinação das razões isotópicas de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, prende-se com o fato destas refletirem: 1) os respetivos rácios na água captada pela planta (que depende da latitude, elevação, distância ao oceano, temperatura e quantidade de precipitação, 2) os efeitos da difusão e evaporação durante a transpiração (afetados pela temperatura, humidade relativa e composição isotópica do vapor de água) e 3) as vias metabólicas incluindo as trocas isotópicas entre as moléculas orgânicas e a água na planta (Camin, et al., 2010b).

As variações isotópicas da água no meio ambiente, providenciam um marcador importante do ciclo hidrológico. A interpretação dos rácios isotópicos no vapor de água, chuva, neve e gelo depende do entendimento dos processos (principalmente mudanças de fase) que conduzem a essa variação isotópica (Cappa, 2003). Variação essa, que se deve a que ao longo do ciclo hidrológico, a partir da evaporação da água nos oceanos e da precipitação em direção ao interior das massas terrestres, o fracionamento isotópico vai deixando para trás os isótopos mais pesados (Fry, 2006).

O fracionamento isotópico é um processo governado pelas massas das moléculas envolvidas. Como referido anteriormente, os efeitos isotópicos que determinam o fracionamento das moléculas de água isotopicamente mais pesadas são, por um lado, o fato da massa mais pesada levar a uma velocidade de difusão menor e, por outro lado, o comportamento das ligações químicas ser diferente para as moléculas com massa superior, pois as fases com ligações mais fortes são preferidas (sólida > líquida > vapor) (Sodemann, 2006).

Como exemplo, considere-se o processo de evaporação da água a partir de uma massa de água com composição isotópica igual ao padrão SMOW ($\delta^{18}\text{O} = 0\text{‰}$ e $\delta^2\text{H} = 0\text{‰}$). As moléculas de água isotopicamente mais leves vão evaporar preferencialmente e vão formar vapor de água empobrecido nos isotopómeros mais pesados, relativamente ao padrão, e deixar para trás um corpo de água (superfície do oceano) enriquecido nestas formas mais pesadas. Por outro lado, quando o vapor de água atmosférico condensa em gotas de água, as moléculas de água mais pesadas vão preferencialmente formar uma fase líquida (ou sólida), originando chuva enriquecida e deixando para trás uma fase de vapor empobrecida nestas formas mais pesadas, ou seja, com um $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ cada vez mais negativo (Figura 18).

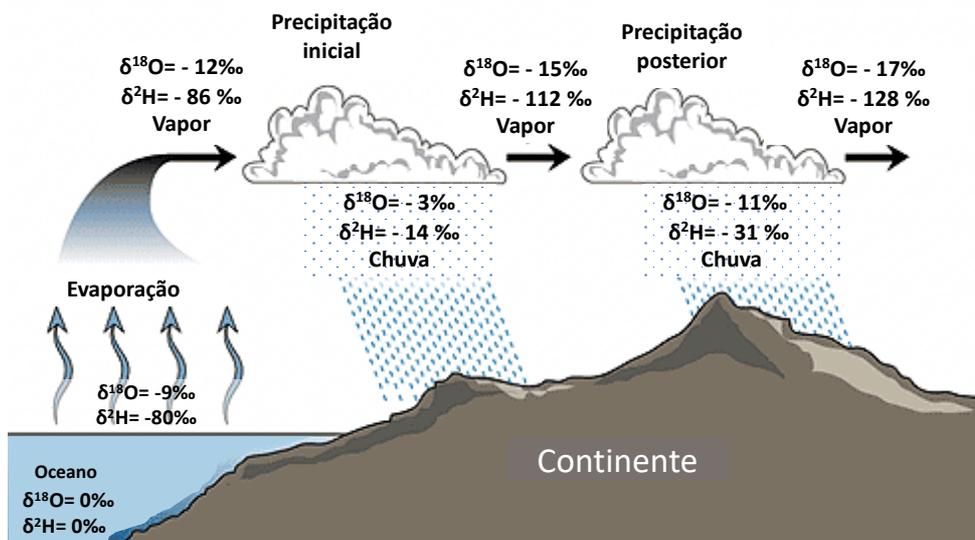


Figura 18 – Processos de fracionamento ao longo do ciclo hidrológico. $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ relativamente ao padrão de referência VSMOW (adaptado de <http://www.sahara.arizona.edu/programs/isotopes/oxygen.html>)

Se o sistema oceano-atmosfera estivesse em equilíbrio termodinâmico então a determinação do fracionamento isotópico durante a evaporação seria relativamente fácil. No entanto, o sistema oceano-atmosfera não é um sistema em equilíbrio, e tanto as propriedades microscópicas da água, como as propriedades macroscópicas do transporte das moléculas de água através do ar, são importantes para compreender o fracionamento isotópico no vapor de água e na precipitação (Cappa, 2003).

A evaporação é o primeiro passo do ciclo hidrológico e exerce um papel crucial na determinação dos rácios isotópicos na precipitação a nível global. A evaporação a partir da superfície de um corpo de água está sujeita a fracionamentos isotópicos de equilíbrio e cinéticos como explica o modelo proposto por (Craig & Gordon, 1965). Diretamente na interface da superfície da água e do ar, as duas fases estão em equilíbrio isotópico, com o vapor a ficar empobrecido em cerca de 9‰ em $\delta^{18}\text{O}$ e 80‰ em $\delta^2\text{H}$ em relação à superfície do oceano (Fry, 2006). No entanto, os efeitos cinéticos são significativos quando a evaporação se dá em direção a ar não saturado, ou quando o vapor de água que se forma acima da superfície do oceano, for continuamente transportado devido a processos turbulentos. Nestes casos, a reação de mudança de fase não consegue alcançar um equilíbrio, é forçada para um lado da equação da reação. De um modo geral, considera-se que a baixas latitudes, onde ocorre a maior parte da evaporação a

partir dos oceanos, a composição isotópica da atmosfera em relação ao oceano é -86‰ para o $\delta^2\text{H}$ e -12‰ para o $\delta^{18}\text{O}$ (Cappa, 2003).

Relativamente à composição isotópica da precipitação, a variação global do $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ é controlada pelo transporte de massas de ar a partir dos trópicos (onde a maior parte da humidade atmosférica é derivada da evaporação de água do oceano) para as regiões polares. Durante o transporte, as massas de ar arrefecem, levando a contínuas condensações e consequente precipitação, até às latitudes mais elevadas em ambos os hemisférios.

A condensação nas nuvens é um processo em equilíbrio, visto que a humidade relativa é de 100%. O fracionamento originado pelos efeitos isotópicos de equilíbrio durante a condensação favorecem a transferência do isótopo mais pesado para a fase líquida, subsequentemente, a contínua destilação das massas de ar leva a um, cada vez maior, empobrecimento em ^2H e ^{18}O na precipitação (fracionamento de Rayleigh) (Dansgaard, 1964). Devido à extensão do fracionamento em si aumentar com a descida das temperaturas, a depleção em ^2H e ^{18}O na precipitação resultante do fracionamento de Rayleigh, é ampliada durante o transporte em direção às latitudes mais elevadas onde se observam os valores isotópicos mais baixos (van der Veer, Voerkelius, Lorentz, Heiss & Hoogewerff, 2009) (Figura 19).

A primeira avaliação detalhada dos fatores que determinam a composição isotópica da precipitação foi feita por Dansgaard (1964). Ele demonstrou que a distribuição geográfica na composição isotópica da precipitação estava relacionada com parâmetros ambientais, tais como a latitude, altitude, distância ao oceano, quantidade de precipitação e temperatura.

A composição isotópica da precipitação exibe uma variação em função do efeito de Rayleigh, com o empobrecimento progressivo das nuvens ao longo do ciclo hidrológico, e da temperatura, que afeta o fracionamento de equilíbrio entre as nuvens e a precipitação formada. Este efeito da temperatura e empobrecimento progressivo, está por trás da variação geográfica e sazonal da composição isotópica da precipitação. Os efeitos desta variação podem ser resumidos em:

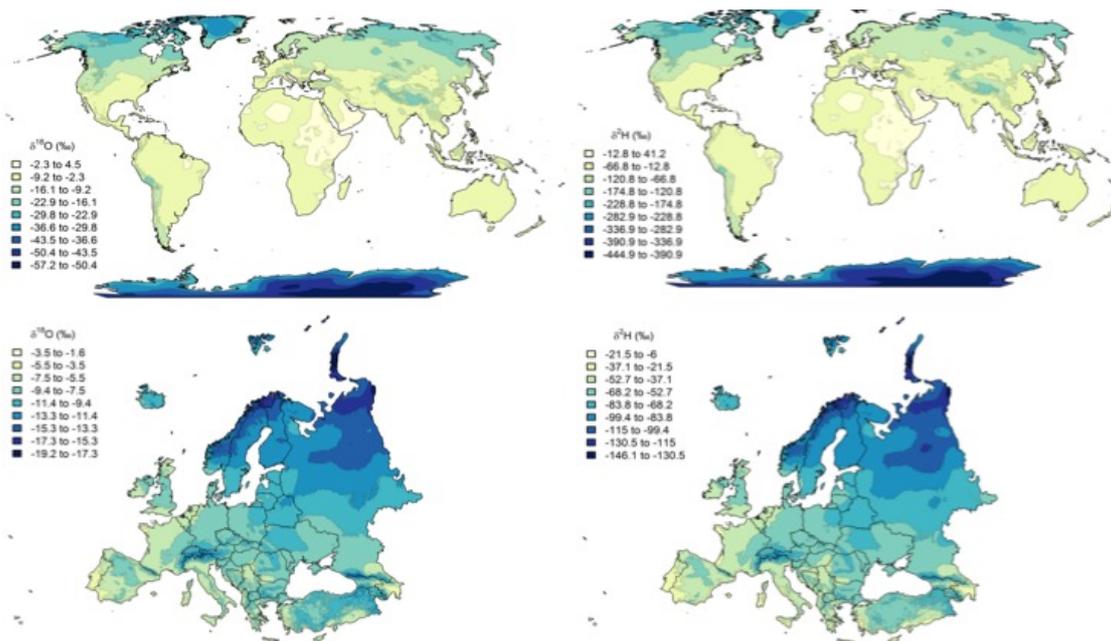


Figura 19 – Valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ da precipitação anual global e no continente europeu (adaptado de <http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/>)

Efeito de latitude - A precipitação vai ficando cada vez mais empobrecida à medida que se avança para latitudes mais elevadas.

Efeito de altitude - Os rácios isotópicos da precipitação geralmente diminuem com a altitude, no entanto essa diminuição não é linear, é influenciada pela saturação do vapor de água e pela temperatura.

Efeito continental - Os rácios isotópicos diminuem à medida que aumenta a distância ao oceano. Os valores isotópicos vão sendo mais negativos à medida que as nuvens avançam nas massas continentais.

Efeito sazonal – Os valores isotópicos são mais negativos no inverno e menos negativos no verão.

Efeito de quantidade – Os valores isotópicos são mais negativos quando a quantidade de precipitação é muito elevada. A humidade relativa aumenta diminuindo a evaporação que se dá durante a precipitação (como acontece por exemplo durante tempestades em zonas tropicais).

Os átomos de hidrogénio e oxigénio que compõem as plantas são predominantemente provenientes da água, pelo que os processos que afetam a composição isotópica da água, também afetam a composição isotópica das plantas. As

maiores fontes da variação isotópica na água das plantas é a composição isotópica da precipitação e o enriquecimento nos isótopos pesados (tanto ^2H como ^{18}O) na água de evaporação ao nível da superfície do solo e da evaporação da superfície das folhas durante a transpiração.

A captação de água pela planta não implica nenhum processo de fracionamento, pelo que a água no xilema é idêntica à água do solo até que alcance as folhas onde se dá a evaporação. A transpiração nas folhas leva a um fracionamento da água proveniente do xilema e esta torna-se enriquecida nos isótopos pesados. Este é um dos motivos pelo qual a determinação do enriquecimento isotópico nas folhas está relacionado com a envolvente ambiental, nomeadamente a humidade relativa. Note-se que o hidrogénio e oxigénio dos compostos orgânicos integrantes dos tecidos vegetais podem ser provenientes de ambos os reservatórios de água pelo que o $\delta^2\text{H}$ e o $\delta^{18}\text{O}$ na matéria orgânica é influenciado tanto pela água do xilema como pela água enriquecida das folhas (Marshall et al., 2007).

2.3.2.1 – FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DO HIDROGÉNIO

A principal fonte de hidrogénio de qualquer composto orgânico na biosfera é a água e, no caso específico das plantas, é a água presente nas folhas. O rácio $^2\text{H}/^1\text{H}$ está dependente de fatores geográficos (altitude, latitude, etc.), climáticos (precipitação, temperatura, humidade, etc.), fisiológicos (evapotranspiração nas plantas) e fatores relacionados com o metabolismo.

A transferência de H^+ da água para as moléculas orgânicas normalmente requiere uma redução para formar NADPH. A primeira grande mudança no valor de $\delta^2\text{H}$ foi observada por Yakir e DeNiro (1990) que estipularam um fracionamento na celulose relativamente à água de 171‰. No entanto, no geral, o valor médio do $\delta^2\text{H}$ não é tão negativo, devido ao enriquecimento de posteriores trocas com a água durante muitas das reações metabólicas (Hayes, 2001).

O H do NADPH é a fonte de hidrogénio mais importante na biossíntese de produtos secundários. As reações mais relevantes para o fracionamento isotópico do hidrogénio são as que implicam transferências entre grupos funcionais e o NADPH, entre ligações duplas $\text{C}=\text{C}$ através de flavoproteínas e adição ou remoção de água nas ligações duplas

C=C através de liases (Schmidt, Werner & Eisenreich, 2003). No entanto, estas reações ocorrem em sistemas parcialmente fechados, o que implica que os efeitos do fracionamento estão dependentes da quantidade de hidrogénio disponível para as reações e se se trata de reações metabólicas que originam produtos que seguem vias diferentes.

A fração lipídica das plantas está diretamente correlacionada com a água meteórica disponível (Schmidt et al., 2003). Existem três razões principais para a variabilidade isotópica do hidrogénio nos lípidos: 1) a composição isotópica dos precursores biossintéticos; 2) efeitos isotópicos associados às reações biossintéticas (incluindo as trocas de H dos compostos orgânicos com a água) e 3) a composição isotópica do hidrogénio adicionado, normalmente a partir do NADPH, durante a biossíntese dos lípidos. Neste último caso, é relevante o fato de poderem existir diferentes reservatórios de NADPH nos diferentes compartimentos da célula. Nas plantas o NADP⁺ é reduzido a NADPH em dois processos distintos: a cadeia de transporte de eletrões associada a fotossíntese no cloroplasto e durante a oxidação dos açúcares na via das pentoses fosfato, no citosol. A fonte do hidrogénio para o NADPH é diferente para cada um dos casos, no caso do NADPH nos cloroplastos, proveniente da fotossíntese, a fonte do hidrogénio é a água. No caso do NADPH presente no citosol, proveniente da via das pentoses fosfato, a fonte de hidrogénio são as ligações com o carbono nos açúcares (Sessions, Burgoyne, Schimmelmann & Hayes, 1999).

2.3.2.2 – FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DO OXIGÉNIO

O oxigénio é um bioelemento muito importante, fornece grupos funcionais para a maioria dos compostos orgânicos, contribuindo assim para as suas propriedades físicas e químicas. As possíveis fontes de oxigénio em qualquer material orgânico são o dióxido de carbono atmosférico ($\delta^{18}\text{O}$ de +40,3 a +42,57‰, dependendo da latitude e altitude) as águas subterrâneas ($\delta^{18}\text{O}$ de -10 a +2‰ que levam a que a água das folhas tenha $\delta^{18}\text{O}$ de -5 a +10‰) e o oxigénio atmosférico ($\delta^{18}\text{O}$ de +23,5 a +23,8‰) (Mader, Schmidt, van Geldern & Barth, 2017; Schmidt, Werner & Roßmann, 2001). No entanto, apenas o oxigénio proveniente da água no solo parece ter relevância na composição isotópica exibida pelas moléculas orgânicas produzidas pelas plantas. Yakir e DeNiro (1990)

avaliaram as diferentes fontes de oxigênio na formação da celulose. Neste estudo, em que os raios isotópicos do O₂ atmosférico e do CO₂, eram controlados, verificaram que o δ¹⁸O da celulose não refletia de forma evidente nenhuma destas fontes de oxigênio, mas sim da água captada pela planta.

Além dos fatores mencionados anteriormente, que influenciam a composição isotópica da precipitação, o rácio isotópico ¹⁸O/¹⁶O nos tecidos vegetais reflete não só a fonte de água das plantas, mas também os efeitos da evaporação e difusão durante a respiração e as trocas isotópicas entre as moléculas orgânicas e a água.

A evaporação de água nas folhas influencia a composição isotópica do material orgânico nas plantas. Este enriquecimento em ¹⁸O deve-se a um fracionamento cinético na difusão de vapor de água nos estomas durante a transpiração. Quanto maior for a condutância nos estomas, menor será o enriquecimento.

Além do fracionamento isotópico, que resulta no enriquecimento em ¹⁸O nas folhas devido à evaporação, a troca de átomos de oxigênio entre moléculas orgânicas e a água, também influencia o δ¹⁸O no material vegetal. Os átomos de oxigênio nos grupos carbonilo estão 25 a 30‰ mais enriquecidos do que a água a partir do qual se formam (Barbour, Cernusak & Farquhar, 2005).

3 - TÉCNICA ANALÍTICA

Os avanços a nível analítico e equipamentos cada vez mais precisos, levaram a um aumento da aplicação de técnicas que utilizam as variações dos isótopos estáveis como marcadores naturais em processos biológicos, químicos e físicos (Sharp, 2017). Atualmente estas técnicas são utilizadas em geologia, ecologia, arqueologia, climatologia, mas também em áreas mais específicas como na proteómica (Schneider & Hall, 2005), na bioquímica como marcadores das vias metabólicas (Batista Silva, Daloso, Fernie, Nunes-Nesi & Araujo, 2016), na indústria farmacêutica para conceção de novos fármacos (Zachleder et al., 2018), para determinar a proveniência de medicamentos (Wokovich, Spencer, Westenberger, Buhse & Jasper, 2005) ou substâncias utilizadas na produção de medicamentos (Jasper, Zhang, Poe & Linhardt, 2015), na indústria cosmética (Camin, Bontempo, Ziller, Piangiolino & Morchio, 2010), etc..

Nos últimos anos a determinação dos rácios isotópicos de elementos leves como o carbono, o hidrogénio e o oxigénio têm tido uma importância crescente na verificação da autenticidade e proveniência de diferentes tipos de alimentos (Gonzalvez, Armenta & de la Guardia, 2009), pois ao contrário dos métodos analíticos químicos a espetrometria de razões isotópicas utiliza um parâmetro físico que permite distinguir substâncias quimicamente idênticas (Rossmann, 2001)

Neste estudo determinaram-se as razões isotópicas do carbono, hidrogénio e oxigénio através da técnica hifenada EA-IRMS (Análise Elementar – Espetrometria de Massa de Razões Isotópicas) em azeites de diversas localizações referentes a 2 regiões com diferentes características geográficas e edafoclimáticas. Os dados analíticos obtidos juntamente com as variáveis relacionadas com a localização das amostras requerem uma abordagem quimiométrica de todos os parâmetros considerados, pelo que diversas técnicas de quimiometria foram aplicadas.

3.1 - ESPETROMETRIA DE MASSA DE RAZÕES ISOTÓPICAS

A espetrometria de massa foi um dos instrumentos fulcrais em avanços científicos notáveis, em diversas áreas de estudo, desde o início do séc. XX. O espectrómetro de massa, originalmente desenvolvido para estudos na área da física, permitiu a descoberta

dos isótopos, o seu reconhecimento como espécie fundamental na composição dos elementos e na investigação da composição isotópica elementar. A espectrometria de massa de razões isotópicas é uma técnica metrológica, de elevada precisão que tem sido usada na química, bioquímica, cosmologia, ciências ambientais, geologia, física e pesquisa nuclear (De Laeter & Kurz, 2006).

Para alcançar níveis de precisão com valores de δ que podem ir a 0,1‰, este equipamento requer a capacidade de diferenciar rácios isotópicos com uma precisão de 10^{-6} , e isto requer tecnologia específica (Sabatelli, Pearson & Jasper, 2017). O espectrómetro de massa de razões isotópicas (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry) difere dos instrumentos convencionais na área da espectrometria de massa, pois o produto que se pretende analisar é conhecido e os campos elétrico e magnético são mantidos constantes para que as variações isotópicas de uma espécie química sejam medidas com elevada precisão. Para proceder à análise isotópica as amostras têm de ser introduzidas no IRMS sob a forma de gases puros. Existem diferentes abordagens na preparação de amostras para análise isotópica. O analisador elementar é uma delas e foi o primeiro sistema hifenado ao IRMS. Atualmente existem outras técnicas, nomeadamente as que aliam a cromatografia à análise isotópica como a técnica de GC-IRMS (Gas Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry) que permite a análise isotópica de compostos específicos.

Os principais componentes do EA-IRMS encontram-se esquematizados nas figuras 20 e 21 e consistem em quatro passos fundamentais: A combustão ou pirólise da amostra utilizando o analisador elementar, a introdução dos gases obtidos na fonte iónica do espectrómetro de massa através de uma interface, a ionização das moléculas de gás e posterior separação e deteção dos iões no espectrómetro de massa e, por último, o registo e avaliação dos dados obtidos (Carter & Barwick, 2011).

3.1.1 - ANALISADOR ELEMENTAR

Um analisador elementar permite a medição em *bulk* das amostras e o seu funcionamento baseia-se fundamentalmente na conversão de uma amostra líquida ou sólida em gás a altas temperaturas. A conversão da amostra em gás pode ser efetuada de 2 modos diferentes: combustão ou pirólise. O modo de combustão utiliza-se para a

determinação das razões isotópicas de carbono, azoto e enxofre, enquanto o modo de pirólise se utiliza na determinação do hidrogénio e oxigénio.

3.1.1.1 - MODO DE COMBUSTÃO

No modo de combustão, a amostra é sujeita a uma temperatura de 1020°C utilizando o oxigénio como comburente obtendo-se assim o carbono, o azoto e o enxofre da amostra sob a forma de CO₂, N₂ e SO₂ respetivamente.

A combustão dá-se numa atmosfera enriquecida com O₂, num reator de quartzo, de modo a produzir CO₂, NO_x e H₂O. Finalizada a combustão, é removido o excesso de oxigénio e o NO_x é reduzido a N₂. Após o reator encontra-se uma armadilha de água e uma coluna de cromatografia que separa os gases provenientes do reator (CO₂ e N₂) que passam por um detetor de condutividade térmica (TCD) que permite visualizar a separação entre os picos de CO₂ e N₂. Os gases são posteriormente transferidos para o detetor (IRMS) através de uma interface. O IRMS mede o rácio isotópico dos iões correspondentes a cada uma das formas isotópicas (isotopólogos) dos gases. Por exemplo, na análise isotópica do carbono o espectrómetro deteta os iões com razões *m/z* de 44, 45 e 46 correspondentes aos iões produzidos de moléculas de CO₂ contendo ¹²C, ¹³C, ¹⁶O, ¹⁷O e ¹⁸O nas suas várias combinações mais frequentes (Carter & Barwick, 2011; Ferreira, 2008)

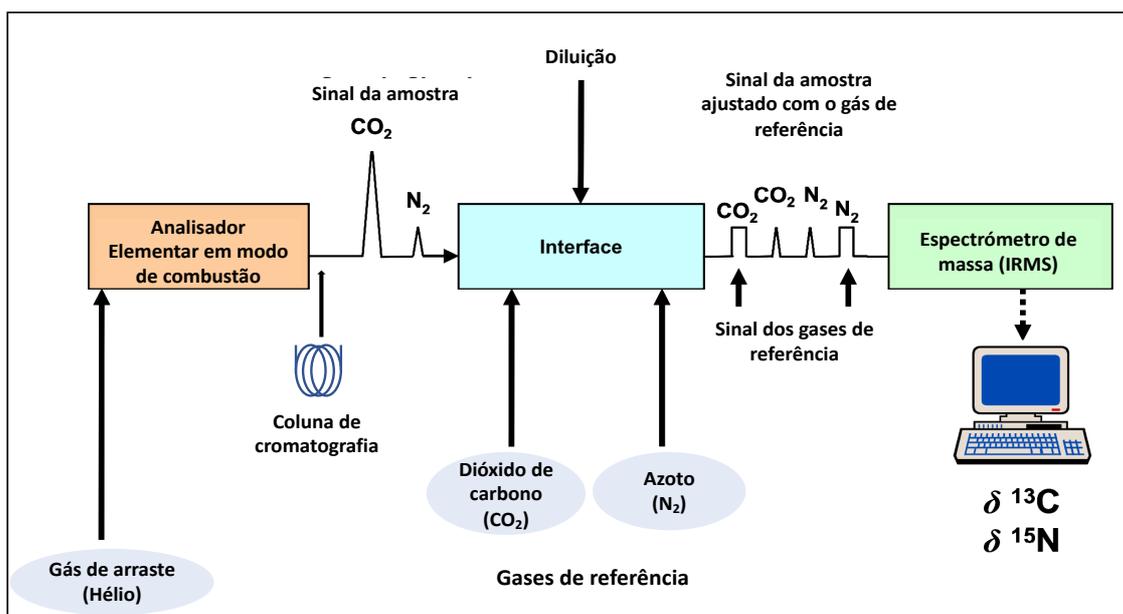


Figura 20 - Esquema simplificado de um EA-IRMS em modo de combustão para a determinação de δ¹³C e δ¹⁵N (adaptado de Carter & Barwick, 2011).

3.1.1.2 - MODO DE PIRÓLISE

Um analisador elementar em modo de pirólise (para a análise de hidrogénio e oxigénio) difere relativamente ao modo de combustão no tipo de reator utilizado e no seu enchimento, que neste caso é um reator cerâmico contendo um tubo de carbono vítreo. A pirólise dá-se na ausência de oxigénio (a decomposição química dá-se pela ação da temperatura) a uma temperatura de 1450 °C e os produtos formados são o CO e o H₂, utilizados para a determinação isotópica do oxigénio e hidrogénio respetivamente. Também estes são separados por uma coluna de cromatografia, passam no detetor de condutividade térmica (TCD) e são transferidos para o detetor (IRMS) através de uma interface.

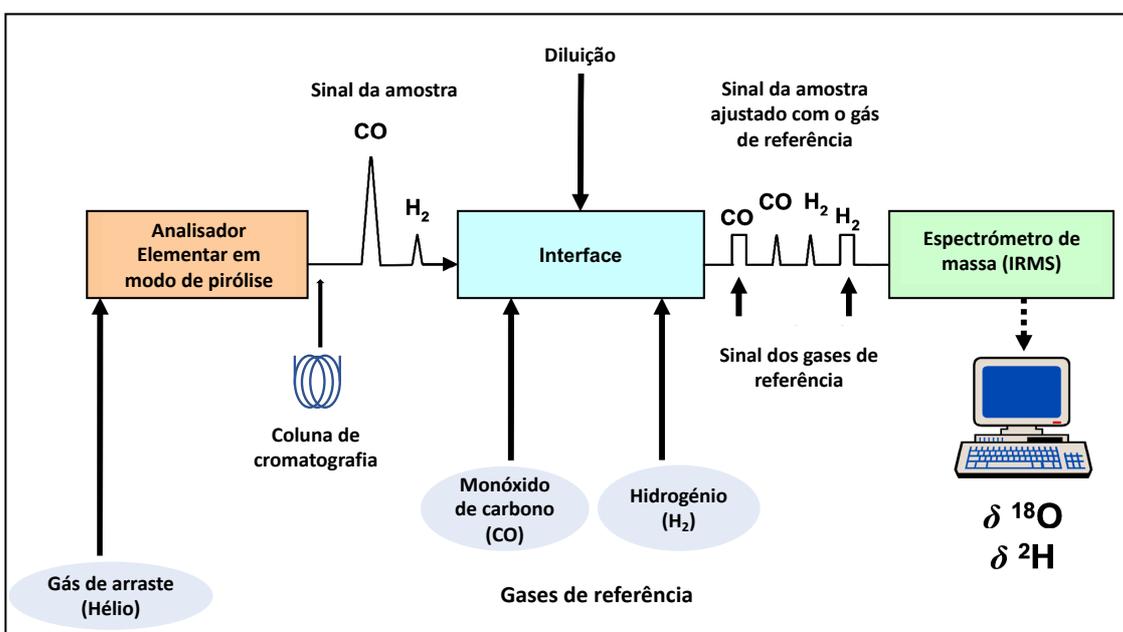


Figura 21 - Esquema simplificado de um EA-IRMS em modo de pirólise para a determinação de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ (adaptado de Carter & Barwick, 2011).

3.1.2 - INTERFACE

A interface permite ligar o analisador elementar ao IRMS. Este instrumento controla o volume dos gases que saem do analisador elementar (que por vezes necessitam de ser ajustados) e proporciona o meio de introdução dos gases de referência (CO₂, N₂, CO e H₂), contra os quais os gases provenientes da amostra vão ser medidos (Figuras 20 e 21).

3.1.3 - IRMS

O espectrómetro de massa de razões isotópicas consiste em 3 secções fundamentais: A fonte (ionização, formação do feixe de iões e aceleração), o analisador (deflexão de iões) e o coletor (deteção de iões) (Figura 22).

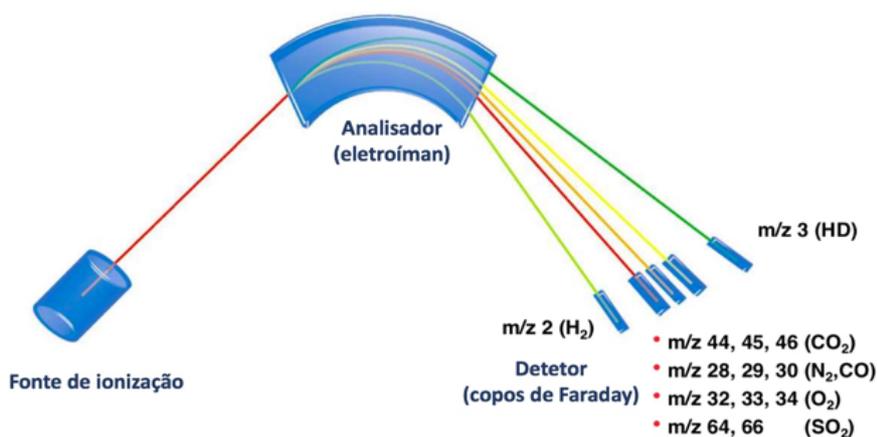


Figura 22 – Esquema simplificado de um Espectrómetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) (adaptado de [http://www.ebd.csic.es/IsotopeCourse/Conferences/2014%20Fundamentals%20of%20IRMS%20-%20EBD%20course%20-%20Sevilla%20\[Lecture%20seule\].pdf](http://www.ebd.csic.es/IsotopeCourse/Conferences/2014%20Fundamentals%20of%20IRMS%20-%20EBD%20course%20-%20Sevilla%20[Lecture%20seule].pdf))

3.1.3.1 - FORMAÇÃO DE IÕES: FONTE IÓNICA DE IMPACTO DE ELETRÕES

Na espectrometria de massa de razões isotópicas a técnica de ionização utilizada é a ionização eletrónica, na qual os iões são gerados através do impacto com eletrões. Na fonte de ionização um filamento de irídio revestido de tungsténio aquecido (cátodo) produz eletrões que passam através da câmara de ionização e são recolhidos na armadilha de eletrões (ânodo). Dois ímanes presentes na câmara de ionização produzem um campo magnético paralelo ao feixe de eletrões que deste modo fica restrito a uma passagem estreita o que faz aumentar o número de iões criado por molécula de gás. Quando uma amostra gasosa passa pela câmara de ionização as suas moléculas são atingidas pelo feixe de eletrões a alta velocidade, esta aproximação ou colisão entre os eletrões do feixe e as moléculas gasosas pode originar a formação de um ião negativo (pela captação de um eletrão) ou, pelo contrário, originar a remoção de um eletrão da molécula formando um ião positivo (ex: CO₂⁺). São estes iões positivos

que são acelerados para fora da câmara de ionização e focados com um sistema de lentes até ao detetor.

3.1.3.2 - DEFLEXÃO DE IÕES: O ELETROÍMAN

Uma partícula carregada em movimento cria um campo magnético. Se esta partícula se move num campo magnético externo vai haver uma força aplicada na partícula à medida que esta interage com o campo magnético. Esta força é chamada força de Lorentz. A força de Lorentz é perpendicular à direção em que se desloca a partícula e perpendicular à direção do campo magnético. A força de Lorentz deflete as partículas num caminho circular com um raio que é função tanto da massa da partícula como da sua carga. O resultado é que os iões ao passarem por um campo magnético externo são separados em feixes individuais, cada feixe tendo um rácio de massa/carga (m/z) único. Deste modo quando um ião de massa m e carga z é acelerado por um potencial V e se desloca num campo magnético uniforme B , então o ião é forçado a mover-se numa órbita circular de raio r (devido do efeito da força de Lorentz). Este movimento é definido pela equação (3) e é o princípio base dos espectrómetros de massa de setor magnético.

(3)

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{B^2 r^2}{2V} \right)$$

Nos espectrómetros de massa de setor magnético, campos eletrostáticos aceleram os iões para o exterior da fonte de ionização.

3.1.3.3 - DETEÇÃO DE IÕES: COLETOR MÚLTIPLO (“FARADAY CUPS”)

O copo de Faraday capta as partículas carregadas no vácuo. Quando os iões atingem o metal de que é feito o copo de Faraday, eletrões fluem através de um circuito eletrónico ao encontro desses iões de modo a neutralizá-los. Este fluxo de eletrões é uma corrente que pode ser medida e a sua magnitude é proporcional ao número de iões

que atingem o copo de Faraday. Para determinadas condições todos os iões que atingiram um copo de Faraday em particular têm rácios de massa/carga idênticos. Atualmente os equipamentos têm múltiplos copos de Faraday, permitindo a análise em simultâneo de vários isotopólogos com razões m/z diferentes (por ex. $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ com massa 44, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ com massa 45 ou $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ com massa 46) (Erkkila et al., 2017).

3.1.2 - NOTAÇÃO δ

A composição isotópica de um elemento é normalmente expressa pelo rácio molar (R), ou seja, os isótopos estáveis medem-se como um rácio dos dois isótopos mais abundantes de um dado elemento, mais precisamente, a composição isotópica de uma amostra é medida como o rácio do isótopo mais pesado relativamente ao mais leve (4).

(4)

$$R = \frac{\text{Abundância do isótopo pesado}}{\text{Abundância do isótopo leve}}$$

Por exemplo, para o ^{18}O , que tem uma abundância de 0,204% comparativamente com os 99,759% do ^{16}O , o rácio ($R=^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) é de 0,00204 (Clark & Fritz, 2013).

Medir o rácio isotópico absoluto (ou abundância) não é uma tarefa fácil e requer equipamentos muito sofisticados, além do mais, haveria muita dificuldade em comparar estes valores absolutos entre laboratórios, devido ao erro inerente aos equipamentos, pelo que se optou por aquilo que se pode chamar um rácio aparente ou notação δ . Este rácio aparente consiste em medir o rácio isotópico da amostra comparativamente a um gás de referência. Ao medir o rácio isotópico de um gás de referência conhecido, no mesmo equipamento e ao mesmo tempo, pode-se comparar o rácio da amostra com o rácio da referência, eliminado desse modo o erro associado às variações operacionais. Outro aspeto a considerar é o facto de na maioria dos casos a abundância de um dos isótopos exceder largamente a abundância do outro, por exemplo, o ^{12}C é 89 vezes mais abundante que ^{13}C , conseqüentemente o rácio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é um número muito pequeno, assim a notação δ (5) e (6) representa o rácio normalizado da amostra (R_x), em que o R

é o rácio da abundância do isótopo pesado pelo isótopo mais leve, relativamente a um padrão (R_{std}), em partes por mil (per mil, ‰) (Gannes et al., 1998).

(5)

$$\delta = \left(\frac{R_X - R_{std}}{R_{std}} \right) \times 1000$$

(6)

$$\delta = \left[\left(\frac{R_X}{R_{std}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

A introdução deste conceito visou facilitar a comparação de resultados entre diferentes laboratórios normalizando os dados a uma escala internacional. O termo “normalização” descreve os vários algoritmos que convertem os rácios medidos nos equipamentos para a escala reconhecida internacionalmente, em que os valores são expressos relativamente aos padrões de referência primários. Na maioria dos casos o software dos equipamentos executa esta normalização automaticamente, tal como as correções necessárias para minimizar interferências (Carter & Barwick, 2011).

Os materiais de referência utilizados para calibrar os padrões usados na determinação de isótopos estáveis são distribuídos por agências internacionais como a Agência Internacional de Energia Atómica (IAEA – International Atomic Energy Agency) em Viena na Áustria, a USGS (United States Geological Survey) ou a NIST (National Institute of Standards and Technology) nos Estados Unidos da América. Estes materiais de referência dividem-se em 3 categorias (Stichler, Gonfiantini & Rozanski, 1995):

1) Padrões de referência primários: Materiais naturais ou virtuais relativamente aos quais os rácios de isótopos estáveis em compostos naturais são expressos usando a notação δ (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição isotópica dos padrões de referência primários (adaptado de Hayes, 2002)

	Rácio isotópico	Valor aceite (x 10 ⁶) ^a
Standard Mean Ocean Water (SMOW) ou Vienna Standard Mean Ocean Water (SMOW)	² H/ ¹ H	155,76 ± 0,10
	¹⁷ O/ ¹⁶ O	379,9 ± 1,6
	¹⁸ O/ ¹⁶ O	2005,2 ± 0,43
PeeDee Belemnite (PDB) ou Vienna PeeDee Belemnite (VPDB)	¹³ C/ ¹² C	11180 ± 16
	¹⁷ O/ ¹⁶ O	385,9 ± 1,6
	¹⁸ O/ ¹⁶ O	2067,2 ± 2,1
Air (Air)	¹⁵ N/ ¹⁴ N	3676,5 ± 8,1
Canyon Diablo Troilite (CDT) ou Vienna Canyon Diablo Troilite (VCDT)	³⁴ S/ ³² S	45004,5 ± 9,3

^a – Valores aceites para um intervalo de confiança de 95%

- SMOW (Standard Mean Ocean Water) – Referência usada inicialmente para expressar as variações relativas de ²H/¹H e ¹⁸O/¹⁶O na água. A definição inicial de SMOW era baseada num padrão conhecido por NBS-1, uma amostra de água do rio Potomac, no entanto, a composição isotópica de SMOW era um conceito, o padrão não existia fisicamente, como tal, não podia ser usado para a calibração de medidas laboratoriais. Posteriormente foi criado o V-SMOW (Vienna-SMOW), um padrão físico, com uma composição isotópica praticamente idêntica à definida inicialmente para o SMOW e utilizado universalmente como padrão de referência primário para expressar as variações dos isótopos estáveis de oxigénio e hidrogénio e define o valor “0” para o δ ¹⁸O e o δ ²H.
- PDB (Peedee Belemnite) – Padrão primário utilizado para expressar as variações entre isótopos estáveis de carbono e oxigénio. Consiste num carbonato de cálcio proveniente de uma belemnite (grupo extinto de cefalópodes) descoberta num depósito marinho da formação Peedee (formação geológica do Cretácio, na Carolina de Sul, Estado Unidos). Este padrão também não existe fisicamente, uma vez que se esgotou faz muito tempo. Atualmente utilizam-se outros materiais indiretamente calibrados relativamente a ele, nomeadamente o NBS-19, calibrado versus um

hipotético VPDB (Vienna-PDB) com um valor isotópico supostamente idêntico ao PDB original.

- N₂ atmosférico – O azoto presente na atmosfera tem uma composição isotópica extremamente homogênea e como tal bastante adequado como padrão de referência primário para as determinações dos isótopos estáveis de azoto.
- CDT (Canyon Diablo Troilite) – Padrão primário para expressar variações entre os isótopos estáveis de enxofre e, tal como o PDB, este padrão já se esgotou. Consistia inicialmente num sulfureto de ferro presente num meteorito originário do Canyon Diablo no Arizona, Estados Unidos. Atualmente utilizam-se padrões de sulfureto de prata nomeadamente o IAEA-S1 e o IAEA-S2 calibrados versus um hipotético V-CDT (Vienna-CDT).

2) - Materiais de calibração: Compostos naturais ou sintéticos cuidadosamente calibrados com os padrões de referência primários (adotados internacionalmente).

2.1) – Materiais de calibração internos ou padrões de trabalho: Materiais de calibração utilizados internamente nos laboratórios e cuja rastreabilidade até aos padrões primários pode ser estabelecida.

3) – Materiais de inter-comparação: Compostos naturais ou sintéticos usados em ensaios inter-laboratoriais para aferir a qualidade das medições efetuadas.

Os padrões primários utilizados na notação δ têm um valor de 0‰, o que de acordo com a própria definição de δ faz sentido, porque quando um padrão é medido contra ele próprio a diferença é “zero”. O que não quer dizer que os padrões não tenham uma determinada quantidade de isótopos pesados ou leves, simplesmente que a diferença relativamente ao padrão não existe (Fry, 2006). Os valores de δ são frequentemente valores negativos, o que significa que a amostra que estamos a medir é menos enriquecida no isótopo pesado que o padrão contra a qual a estamos a medir (Sulzman, 2007).

3.2 - QUIMIOMETRIA

O termo quimiometria foi inicialmente utilizado em 1971 para descrever o crescente uso de modelos matemáticos, princípios estatísticos e outros métodos baseados na lógica, no campo da química e em particular no campo da química analítica. Estes métodos são utilizados para a extração de informação relevante de dados químicos multivariados. A quimiometria é pois, uma área interdisciplinar que envolve estatística multivariada, ciência computacional na modelação matemática e química analítica (Gemperline, 2006). O principal objetivo da aplicação de métodos multivariados em química analítica é o reconhecimento de padrões e classificação de objetos (amostras, compostos ou materiais) assim como modelar as relações entre os vários dados analíticos. Os métodos quimiométricos mais utilizados dividem-se em 2 grandes grupos: métodos de aprendizagem não supervisionados e métodos de aprendizagem supervisionados (Brereton, 2007; Otto, 2016; Redlin, 2015).

Nos métodos de classificação não supervisionados não se sabe à partida quais os grupos presentes numa população. Neste tipo de classificação as amostras ou “objetos” têm uma série de características relacionadas com uma classe ou categoria, que não são aparentes em que o objetivo é encontrar grupos de “objetos” que têm características relacionadas que permitam a sua separação em diferentes classes (Gómez-Caravaca et al., 2016).

Os métodos de aprendizagem não supervisionados agrupam dados analíticos usando métodos de agrupamento ou redução de dimensionalidade, isto é, projetando os dados de uma dimensão superior num espaço dimensional inferior, normalmente num plano (Voncina, 2009). Existem diferentes métodos de aprendizagem não supervisionados e a sua escolha depende da área científica em causa (Otto, 2016). Neste trabalho utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de *Clusters* (AC) para avaliar simultaneamente o peso que as variáveis geográficas e climáticas têm nas razões isotópicas e como as variáveis se relacionam entre si.

Por outro lado, os métodos de aprendizagem supervisionados são métodos que originam uma função matemática a partir de dados “treinados”. O modelo é “treinado” com base num conjunto de dados pré-definido, permitindo tomar decisões quanto à classificação de dados novos (DSPA, 2018). Isto é, os métodos de aprendizagem

supervisionados permitem classificar um novo “objeto” atribuindo-o a uma determinada categoria tendo por base um conjunto prévio de elementos que se conhece a que categorias estão associados (González, 2015). A aplicação de métodos de aprendizagem supervisionados na área da química prende-se com o reconhecimento de classes de compostos, determinação da origem das amostras, deteção de baixa/alta qualidade dos produtos, etc. (Voncina, 2009).

4 - METODOLOGIA

4.1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

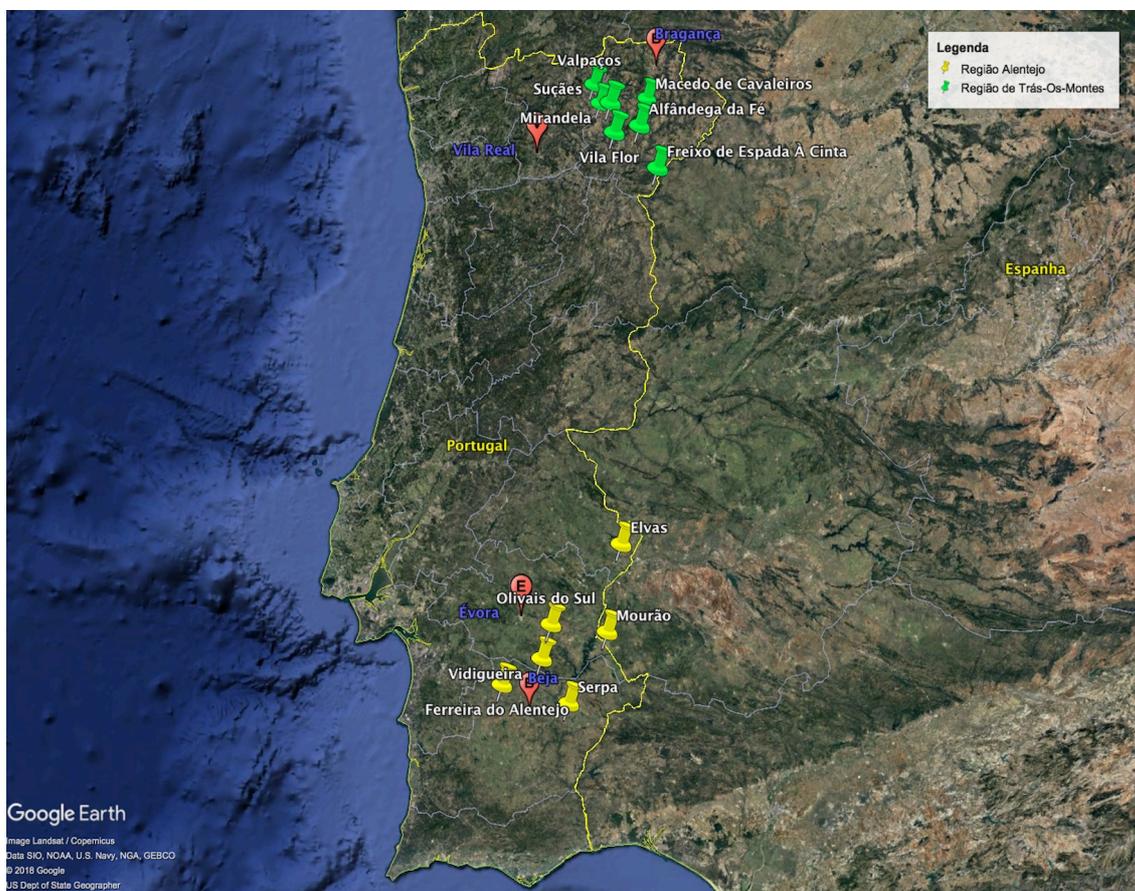


Figura 23 - Localizações da origem das amostras das regiões Alentejo e Trás-os-Montes

Foram analisadas um total de 38 amostras de AVE produzidas em diferentes localizações de 2 regiões de Portugal, nomeadamente Alentejo e Trás-os-Montes (figura 23), durante o ano de produção de 2016.

Para a maioria das amostras, foram processados separadamente 5kg de cada variedade num sistema Abencor® nas 24 horas seguintes à colheita. A moenda das azeitonas foi efetuada com moinho de martelos e a batedura da pasta obtida foi efetuada a 25°C durante 30 min. Por fim o azeite foi separado por centrifugação. Algumas das amostras foram obtidas diretamente dos moinhos de modo a evitar a mistura com outras variedades ou de outras localizações, antes do engarrafamento. As amostras foram armazenadas em garrafas de vidro escuro, a 20°C e abrigadas da luz.

As áreas dos olivais foram diferenciadas pela latitude (UTM), longitude (UTM), altitude (m), distância ao oceano (km) e condições climáticas, nomeadamente

temperatura média (°C) e precipitação média (mm). Os valores da temperatura média e precipitação média foram obtidos na base de dados do IPMA (Instituto Português do

Tabela 3 - Caracterização das amostras de AVE relativamente à sua variedade, origem e parâmetros climáticos

	Variedade	Origem	Latitude (UTM)	Longitude (UTM)	Altitude (m)	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Distância do oceano (Km)
AArb 3	Arbequina	Évora	38,41	7,72	190	249	18,4	96,27
AArb 4	Arbequina	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
AArb 5	Arbequina	Ferreira do Alentejo	38,06	8,11	140	256,4	18,9	61,99
AAze 1	Azeiteira	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ABla 1	Blanqueta	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ACar 1	Carrasquenha	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ACob 1	Cobrançosa	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
ACob 3	Cobrançosa	Ferreira do Alentejo	38,06	8,11	140	256,4	18,9	61,99
ACob 4	Cobrançosa	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
ACob 5	Cobrançosa	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ACob 6	Cobrançosa	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
ACob 7	Cobrançosa	Évora	38,41	7,72	190	249	18,4	96,27
ACob 8	Cobrançosa	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ACor 1	Cordovil	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
ACor 2	Cordovil	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
ACor 3	Cordovil	Ferreira do Alentejo	38,06	8,11	140	256,4	18,9	61,99
ACor 4	Cordovil	Serpa	37,94	7,60	218	256,4	18,9	114,17
AGal 1	Galega	Ferreira do Alentejo	38,06	8,11	140	256,4	18,9	61,99
AGal 2	Galega	Mourão	38,36	7,29	186	249	18,4	132,69
AGal 4	Galega	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
AMad 1	Madural	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
APic 1	Picual	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
APic 3	Picual	Évora	38,41	7,72	190	249	18,4	96,27
APic 4	Picual	Vidigueira	38,17	7,72	163	256,4	18,9	92,76
APic 5	Picual	Ferreira do Alentejo	38,06	8,11	140	256,4	18,9	61,99
AVer 1	Verdeal	Elvas	38,88	7,16	328	249	19,3	197,1
TM Cob 1	Cobrançosa	Macedo de Cavaleiros	41,53	6,95	655	227,5	14,2	153,56
TM Cob 2	Cobrançosa	Mirandela	41,48	7,18	254	247	15,5	134,78
TM Cob 3	Cobrançosa	Alfandega da Fé	41,34	6,96	549	227,5	14,2	150,71
TM Cob 4	Cobrançosa	Mirandela	41,49	7,26	359	247	15,5	134,78
TM Cob 6	Cobrançosa	Valpaços	41,61	7,31	428	247	15,5	126,27
TM Cob 7	Cobrançosa	Vila Flor	41,31	7,15	550	247	15,5	133,27
TM Mad 1	Madural	Vila Flor	41,30	7,16	555	247	15,5	133,27
TM Mad 2	Madural	Mirandela	41,49	7,18	228	247	15,5	134,78

* Valores da precipitação e temperatura referentes ao período entre Agosto e Dezembro

Mar e da Atmosfera) e referem-se ao período entre Agosto e Dezembro de 2016, meses em que se dá a acumulação de lípidos no mesocarpo das azeitonas durante a sua maturação (Bontempo et al., 2009; Camin, et al., 2010b; Mihailova, Abbado, Kelly & Pedentchouk, 2015; Portarena et al., 2015). A altitude, longitude e latitude foram obtidas no Google Earth com base nas indicações dos produtores. A tabela 3 mostra a variedade, a origem geográfica e dados climáticos referentes ao período de maturação das azeitonas utilizadas para a produção dos azeites.

4.2 - ANÁLISE ISOTÓPICA

A medição das razões de isótopos estáveis de carbono, hidrogénio e oxigénio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, respetivamente) das amostras de azeite das diferentes localizações foi determinada por análise elementar-espetrometria de massa de razões isotópicas (EA-IRMS). O sistema EA-IRMS que se encontra localizado no Laboratório de Espectrometria de Massa do Laboratório HERCULES, consiste num analisador elementar Flash 2000 HT (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com dois reatores: um reator de combustão para análise de C, N e S e um reator de pirólise para determinação de H e O. O analisador elementar está acoplado a uma interface de fluxo contínuo ConFlo IV (Thermo Scientific) que faz a ligação entre o analisador elementar e o espectrómetro de massa de razões isotópicas Delta V Advantage (Thermo Scientific).

O analisador elementar utiliza hélio como gás de arrastamento. Na análise isotópica do carbono foi usado com um fluxo de 80mL/min, enquanto na análise do hidrogénio e oxigénio o fluxo foi de 120mL/min. As amostras de azeite foram pesadas (0,2 a 0,5 mg) em cápsulas (Elemental Microanalysis, Devon, Reino Unido) de estanho no caso da análise de carbono e prata para hidrogénio e oxigénio contendo no seu interior um disco absorvente de fibra de vidro (Interscience). As cápsulas foram fechadas, dobradas e prensadas até formarem uma pequena esfera e carregadas no carrossel do amostrador automático MAS 200R (Thermo Scientific). Do mesmo modo, foram preparados os padrões adequados e analisados em simultâneo com as amostras.

Na análise de $\delta^{13}\text{C}$, as cápsulas, com amostras/padrões provenientes do amostrador automático, seguem para o reator de combustão. As cápsulas entram no reator de quartzo, que se encontra a uma temperatura de 1020 °C, onde se dá a combustão com

um pulso de oxigênio. A amostra e a cápsula fundem na atmosfera temporariamente enriquecida em oxigênio e os produtos da combustão (CO_2 e H_2O) arrastados pelo fluxo de hélio passam para uma armadilha de água, esta é composta por um tubo de vidro de 10 cm contendo perclorato de magnésio anidro ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) que vai retirar a água resultante da combustão. Os gases resultantes da combustão passam por uma coluna cromatográfica de enchimento (Porapak), a 40 °C, para a separação do pico de CO_2 , que é detetado num Detetor de Condutividade Térmica (TCD). O CO_2 é introduzido do IRMS, através da interface, que regula o volume de gases que entram no detetor (o CO_2 proveniente da amostra e o CO_2 de referência). A análise da composição isotópica do CO_2 proveniente da amostra é determinada relativamente à composição isotópica do gás de referência, que foi calibrado com padrões internacionais, logo, de composição conhecida. Os gases de referência são introduzidos no fluxo de hélio em pulsos de 250 mL/min. O CO_2 é detetado nos coletores que medem as razões m/z 44, 45 e 46 referentes a $^{12}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ respetivamente.

Na análise dos rácios isotópicos de oxigênio e hidrogênio utilizou-se o reator de pirólise, constituído por um tubo de carbono vítreo (contendo grânulos de carbono vítreo e lã de prata) rodeado por tubo exterior de porcelana. As cápsulas de prata contendo as amostras/padrões entram no reator, a 1450 °C, sob um fluxo de hélio. Os produtos da pirólise, neste caso o CO e o H_2 , são separados numa coluna de cromatografia de enchimento (Porapak) a 70 °C e detetados no TCD. A análise da composição isotópica do CO e H_2 foi determinada relativamente à composição isotópica dos gases de referência (CO e H_2) previamente calibrados com padrões internacionais e que foram introduzidos no IRMS através da interface em pulsos de 250 mL/min. O CO resultante é detetado nos coletores que medem as razões m/z 30 e m/z 28 e o H_2 medido nos coletores para m/z 2 e para m/z 3.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado de modo a obter a média e desvio padrão. Em cada sequência, as razões isotópicas das amostras foram determinadas simultaneamente com os padrões adequados à amplitude dos valores isotópicos observados. As retas de calibração foram efetuadas com materiais de referência certificados e padrões de trabalho, nomeadamente: IAEA 600 (cafeína), OOIWS (Olive Oil Isotopic Working Standard) e EEZ20 (sacarose) para a determinação isotópica de carbono; IAEA CH-7 (polietileno), OOIWS e CV (colagénio) para a determinação isotópica

de hidrogénio e IAEA 601 (ácido benzoico), OOIWS e ácido hexadecanóico para a determinação isotópica de oxigénio.

As abundâncias dos isótopos estáveis foram expressas segundo a notação δ de acordo com a fórmula (6) referida anteriormente e expressas em partes por mil (‰).

A análise estatística multivariada foi efetuada com o software Statgraphics Centurion XV.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a existência de relação entre a composição isotópica de AVE e a localização geográfica do olival, ou seja, pretendeu-se identificar as razões isotópicas que caracterizavam cada região, bem como, identificar o que distinguia cada uma das regiões. Deste modo, numa fase inicial procedeu-se a uma análise exploratória dos dados com o intuito de caracterizar a amostra global e as amostras parciais (correspondentes a cada localização) e, numa fase seguinte procedeu-se a uma análise multivariada, onde se utilizaram os métodos de aprendizagem não supervisionados, nomeadamente a Análise de Componentes Principais e a Análise de Clusters que (a partir do conjunto total dos dados isotópicos, geográficos e climáticos) têm como objetivo encontrar conjuntos de amostras que possam ser distribuídos por classes, neste caso distinguir os azeites provenientes de regiões diferentes, e quais os fatores que mais influenciam essa distribuição. Quanto aos métodos de aprendizagem supervisionados, efetuou-se uma Análise Discriminante com o objetivo de classificar novas amostras de azeite quanto à sua origem geográfica com base nos dados aqui analisados. Por fim realizou-se uma análise de regressão linear com o objetivo de perceber se é possível através dos dados isotópicos inferir quanto aos parâmetros de localização e climáticos aqui considerados.

5.2.1 - ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

Para caracterizar o conjunto de dados, começou-se por calcular algumas características amostrais, de localização e de dispersão, neste caso, a média, o desvio padrão e os extremos. A tabela 4 mostra a composição isotópica de carbono, hidrogénio e oxigénio das amostras de azeite provenientes das diferentes localizações em Portugal Continental, enquanto na tabela 5 se agruparam as diferentes localizações em 2 grandes regiões, Alentejo e Trás-os-Montes.

Como já mencionado anteriormente, o rácio isotópico do carbono na matéria orgânica das plantas reflete essencialmente os efeitos do meio ambiente na fotossíntese, enquanto os rácios isotópicos de hidrogénio e oxigénio revelam os processos associados à água e providenciam informação em relação à sua fonte de

aquisição (Bontempo et al., 2009; Camin et al., 2010b; Jiménez-Morillo et al., 2020; Marshall et al., 2007).

Tabela 4 - Valores máximo, mínimo, média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nas diferentes localizações

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰, VPDB)	$\delta^2\text{H}$ (‰, VSMOW)	$\delta^{18}\text{O}$ (‰, VSMOW)
Elvas	-30,5 a -27,9 (-29,2±0,7) n=10	-146,6 a -130,7 (-139,5±5,4) n=10	21,2 a 24,5 (22,6±1,0) n=10
Ferreira do Alentejo	-31,8 a -29,8 (-30,7±0,8) n=5	-140,1 a -132,0 (-137,4±3,2) n=5	21,4 a 25,9 (23,4±1,6) n=5
Mourão	-29,1 n=1	-133,3 n=1	22,4 n=1
Olivais do Sul	-30,4 a -29,1 (-29,6±0,7) n=3	-139,5 a -132,4 (-136,3±3,6) n=3	22,2 a 22,9 (22,5±0,4) n=3
Serpa	-29,1 n=1	-138,9 n=1	24,0 n=1
Vidigueira	-30,4 a -29,5 (-30,0±0,3) n=6	-140,6 a -131,3 (-137,9±3,4) n=6	22,3 a 25,5 (23,3±1,1) n=6
Alfandega da Fé	-28,9 n=1	-144,3 n=1	23,2 n=1
Freixo de Espada à Cinta	-29,3 n=1	-151,1 n=1	23,5 n=1
Macedo de Cavaleiros	-30,0 n=1	-148,3 n=1	22,1 n=1
Mirandela	-30,5 a -28,9 (-29,6±0,8) n=3	-152,3 a -148,3 (-150,0±2,1) n=3	21,4 a 22,8 (22,1±0,7) n=3
Suçães	-29,8 a -28,4 (-29,1±1,0) n=2	-148,8 a -148,4 (-148,6±0,2) n=2	22,7 a 23,5 (23,1±0,5) n=2
Valpaços	-30,2 a -29,5 (-29,8±0,5) n=2	-149,4 a -149,0 (-149,2±0,3) n=2	21,5 a 22,6 (22,0±0,8) n=2
Vila Flor	-28,2 a -28,1 (-28,2±0,1) n=2	-156,9 a -150,1 (-153,5±4,8) n=2	23,0 a 23,4 (23,2±0,3) n=2

Tabela 5 - Valores máximo, mínimo, média e desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ nas 2 regiões: Alentejo e Trás-os-Montes

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰, VPDB)	$\delta^2\text{H}$ (‰, VSMOW)	$\delta^{18}\text{O}$ (‰, VSMOW)
Alentejo	-31,8 a -27,9 (-29,7±0,8) n=26	-146,6 a -130,7 (-138,1±4,2) n=26	21,2 a 25,9 (23,0±1,1) n=26
Trás-Os-Montes	-30,5 a -28,1 (29,3±0,8) n=12	-156,9 a -144,3 (-149,7±3,0) n=12	21,4 a 23,5 (22,6±0,7) n=12

A região do Alentejo é caracterizada por verões quentes e secos com as temperaturas máximas médias superiores e com fraca pluviosidade. A região de Trás-

os-Montes embora caracterizada por temperaturas elevadas no verão, que em algumas localizações podem ser semelhantes ao Alentejo, regista as temperaturas mínimas médias mais baixas e, geralmente, valores de precipitação anuais superiores (figura 24). No entanto, embora no ano de 2016 a precipitação média anual na região de Trás-os-Montes tenha sido dentro do espectável, a precipitação no período considerado neste estudo (Agosto a Dezembro) foi ligeiramente superior na região do Alentejo (tabela 3).

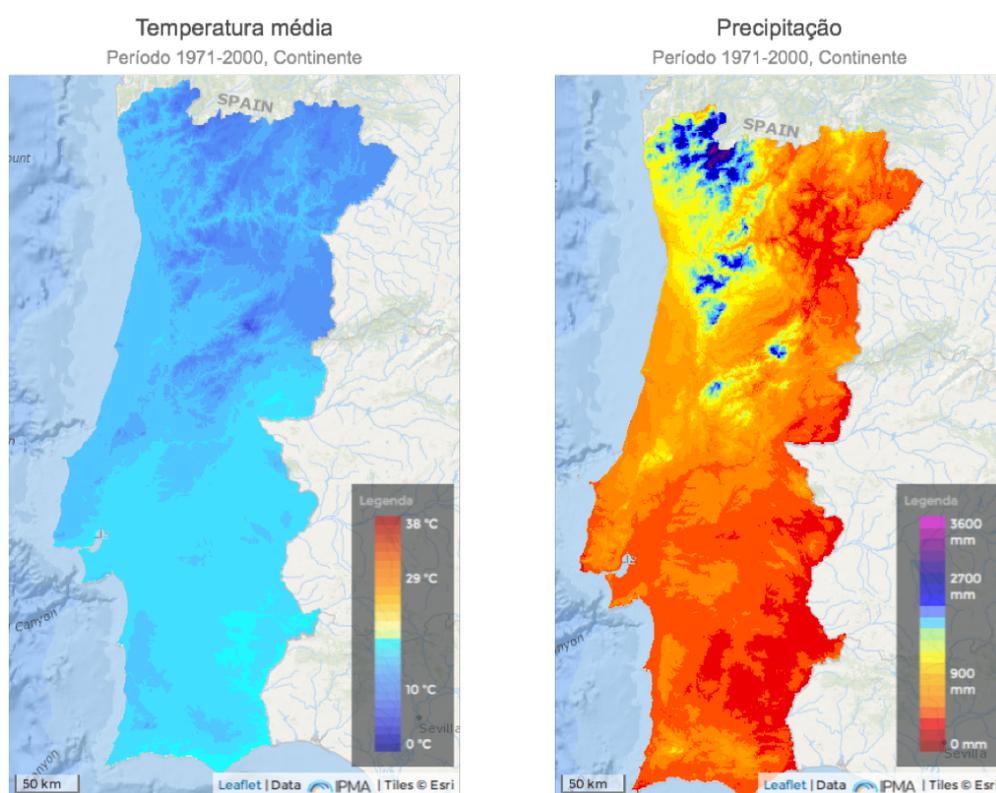


Figura 24 - Normais climatológicas. Média de 30 anos (1971 a 2000) de temperatura e precipitação anual.
<http://portaldoclima.pt/pt/>

Relativamente aos valores de $\delta^{13}\text{C}$ verifica-se que a amplitude é de 3,9‰ e que variam entre -31,8 a -27,9‰, valores consistentes com as plantas que seguem a via metabólica C_3 e com os valores observados para AVE na bibliografia (Chiocchini, Portarena, Ciolfi, Brugnoli & Lauteri, 2016; Iacumin et al., 2009; Portarena, Baldacchini & Brugnoli, 2017; Portarena, Gavrishkova, Lauteri & Brugnoli, 2014), no entanto, observando os valores em cada uma das regiões (tabela 5 e figura 25) verifica-se que há

um ligeiro enriquecimento na Região de Trás-os-Montes, com um valor médio de -29,3‰, comparativamente à região do Alentejo em que o valor médio se situa nos -29,7‰, o que não vai ao encontro do mencionado na bibliografia, que refere que a presença dos isótopos mais pesados é menor em zonas com temperaturas médias mais baixas e níveis de precipitação mais elevados associados a regiões mais a norte (Camin et al., 2010b; Chiocchini et al., 2016).

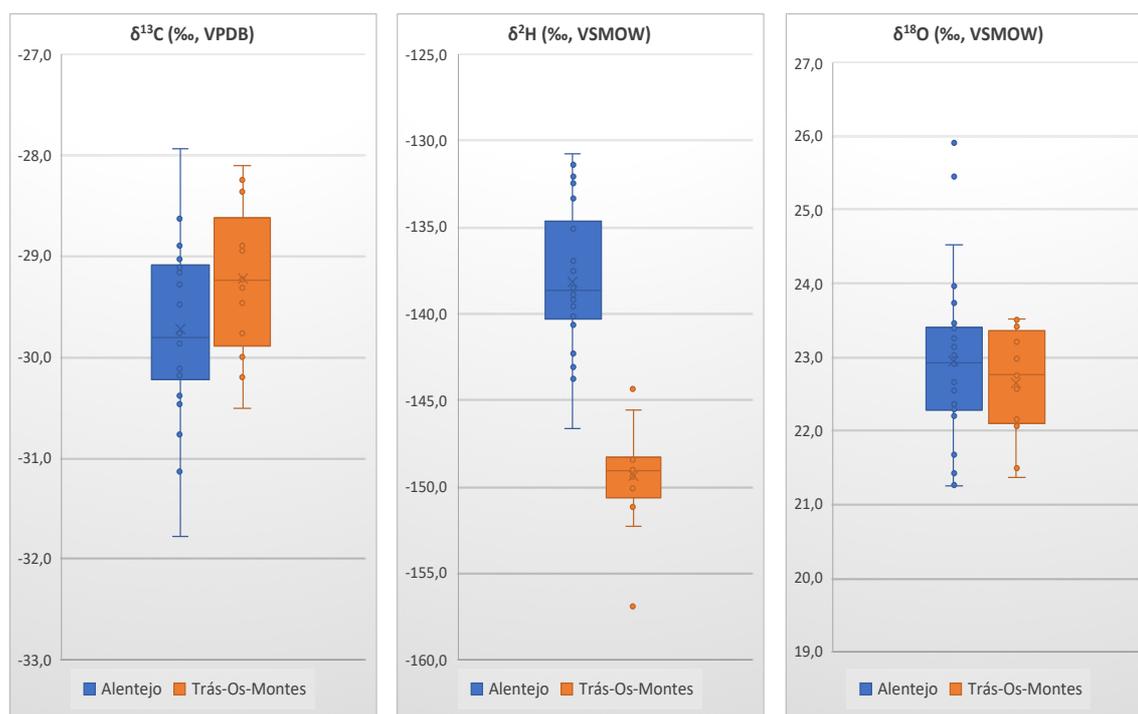


Figura 25 -Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ por região.

Uma das razões pela discrepância nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, pode dever-se ao fato dos azeites provenientes das variedades Picual e Arbequina só se encontrarem nas amostras do Alentejo, visto que estas 2 variedades, como se observa na tabela 6 e figura 26, têm valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ mais baixos, também (Aramendia et al., 2007) observam valores mais baixos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para as variedades Arbequina e Picual. Mas ao considerar o $\delta^{13}\text{C}$ de uma só variedade presente em ambas as regiões (figura 27), como é o caso da variedade Cobrançosa, verifica-se que a diferença é mínima (-29,6‰ no Alentejo e -29,4‰ em Trás-os-Montes), ainda assim mais elevada na região de Trás-os-Montes.

Tabela 6 - Valores médios, mínimos e máximos das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ por variedade de azeitona

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰, VPDB)	$\delta^2\text{H}$ (‰, VSMOW)	$\delta^{18}\text{O}$ (‰, VSMOW)
Arbequina	-31,1 a -29,2 (-30,1±1,0) n=3	-138,2 a -132,4 (-136,3±3,4) n=3	22,3 a 23,5 (22,8±0,6) n=3
Azeiteira	-29,3 n=1	-143,6 n=1	22,6 n=1
Blanqueta	-27,9 n=1	-132,3 n=1	23,3 n=1
Carrasqueira	-30,1 n=1	-130,7 n=1	24,5 n=1
Cobrançosa	-30,8 a -28,2 (-29,5±0,7) n=13	-150,1 a -131,3 (-143,0±6,0) n=13	21,5 a 25,5 (23,0±0,9) n=13
Cordovil	-30,2 a -29,1 (-29,6±0,6) n=4	-143,0 a -138,9 (-140,3±1,9) n=4	22,3 a 24,0 (23,0±0,7) n=4
Galega	-29,8 a -28,9 (-29,3±0,5) n=3	-135,1 a -132,0 (-133,5±1,5) n=3	22,4 a 25,9 (23,8±1,9) n=3
Madural	-29,9 a -28,1 (-29,0±0,9) n=3	-156,9 a -137,5 (-147,6±9,7) n=3	21,3 a 23,0 (21,9±1,0) n=3
Negrinha do Freixo	-29,3 n=1	-151,1 n=1	23,5 n=1
Pical	-31,8 a -30,1 (-30,7±0,8) n=4	-146,6 a -139,5 (-141,7±3,3) n=4	21,4 a 22,9 (22,1±0,7) n=4
Verdeal	-30,5 a -28,4 (-29,3±0,9) n=4	-152,3 a -140,0 (-147,6±5,3) n=4	21,2 a 23,5 (22,4±0,9) n=4

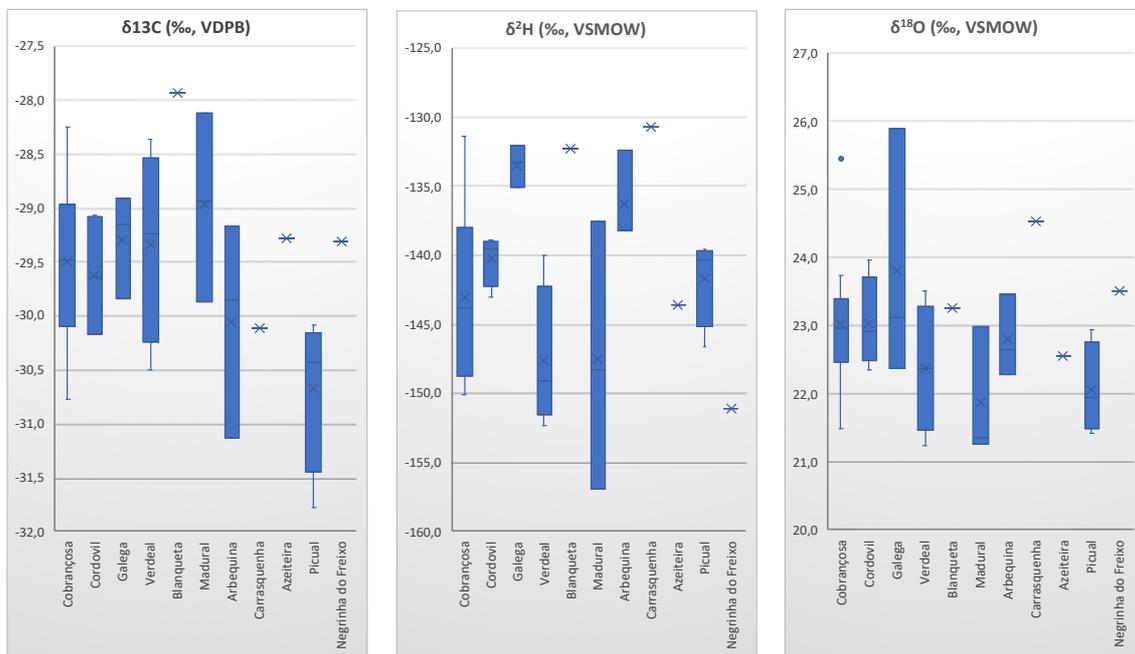


Figura 26 – Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ por variedade.

A importância das variedades na assinatura isotópica nos azeites tem sido assinalada por diversos autores, lacumin et al. (2009) também observam que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ podem ter uma significativa influência da variedade que pode ser superior aos

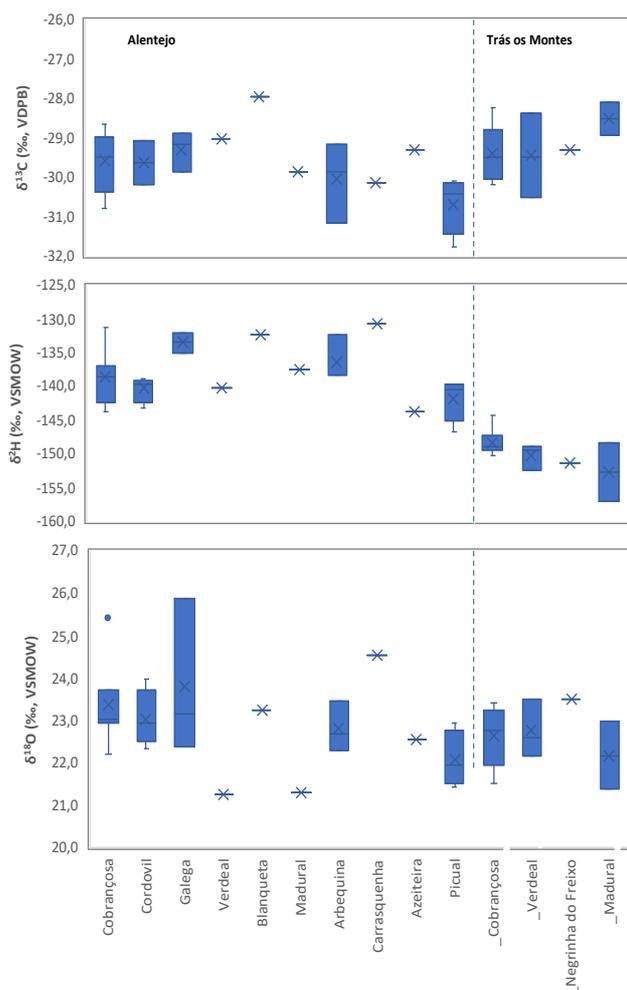


Figura 27 – Caixas de bigodes das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ por variedade na região Alentejo e na região de Trás-os-Montes.

fatores climáticos, pelo menos quando se consideram áreas mais restritas, o que reforça a possibilidade dos valores observados de $\delta^{13}\text{C}$ estarem relacionados com as diferentes variedades presentes nas 2 regiões. Observando a figura 27, que indica os valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ para cada variedade em cada uma das regiões, verifica-se que com exceção da variedade Cobrançosa, as variedades utilizadas para a produção de AVE não são as mesmas, pelo que não se pode excluir as variedades como fator influente na composição isotópica dos AVEs, nomeadamente nas adaptações de cada variedade às condições climáticas.

Portarena et al. (2015) e Royer, Gerard, Naullet, Lees e Martin (1999) estudaram se a variedade, o grau de maturação e a origem geográfica influenciavam a variabilidade isotópica e a composição em ácidos gordos em amostras de AVE. Os autores averiguaram que existia uma correlação significativa entre a composição isotópica e as diferenças climáticas sazonais durante o amadurecimento dos frutos, atestando que diferenças significativas na composição isotópica entre cultivares estava relacionada com o período de maior acumulação de óleo nos frutos e com o perfil em ácidos gordos nomeadamente dos ácidos oleico e linoleico. Verificaram uma correlação positiva entre o ^{13}C e o conteúdo em ácido linoleico e uma correlação negativa com o ácido oleico. Estas diferenças podem ser originadas por efeitos isotópicos cinéticos nas reações catalizadas pelas dessaturases (formação de duplas ligações *cis* que ocorrem por desidrogenação oxidativa a partir do ácido gordo saturado correspondente) que

originam as duplas ligações nas cadeias 18:2. Este efeito isotópico cria um enriquecimento em ^{13}C na cadeia 18:2. Outro efeito isotópico cinético está associado ao alongamento das cadeias de ácidos gordos de 16:0 a 18:0 através da adição de um grupo acetil ao ácido palmítico. A ação destes complexos enzimáticos leva a um fracionamento isotópico que pode diferir entre variedades que tenham uma composição em ácidos gordos diferente. As variedades podem exibir diferentes composições isotópicas pois começam a acumular óleo (a maturar) em períodos ligeiramente diferentes, mas que podem ser o suficiente para refletir possíveis diferenças climáticas, tais como a quantidade de precipitação ou diferentes temperaturas.

Além das possíveis diferenças entre variedades, existem outros fatores a ter em conta. Como já referido anteriormente, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas diferem da composição isotópica do CO_2 da atmosfera devido ao fracionamento resultante da difusão de CO_2 nas folhas da planta (troca gasosa e condutância) e ao fracionamento bioquímico na carboxilação enzimática, que induz uma depleção do ^{13}C em relação ao ^{12}C nos produtos criados a partir da fixação do CO_2 fotossintético (glucose, frutose e manitol) e nos compostos orgânicos produzidos posteriormente. A eficiência da assimilação deste carbono está altamente relacionada com parâmetros ambientais tais como a temperatura aqui considerada, mas também a insolação, a pressão atmosférica parcial de CO_2 e O_2 , a humidade relativa, a humidade do solo, o conteúdo em azoto nas folhas e a disponibilidade de nutrientes (Brugnoli & Farquhar, 2000; Iacumin et al., 2009; Marshall et al., 2007). No contexto deste trabalho os parâmetros relacionados com o stress hídrico têm especial relevância, uma vez que os níveis de precipitação foram atípicos nas regiões consideradas.

Ao observar a tabela 3 verifica-se que embora os valores da temperatura estejam em linha com o espetável (valores médios mais baixos para a região mais a norte) o mesmo não se verifica para a precipitação. No ano de 2016, ao considerar os meses de Agosto a Dezembro (meses em que se dá a acumulação lipídica nas azeitonas), verifica-se que a precipitação foi mais elevada na região Alentejo, deixando os olivais situados na região de Trás-os-Montes sujeitos a um maior stress hídrico podendo esta situação ter influência nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ superiores na região Norte. Neste caso o stress hídrico pode ser um fator relevante pois induz o fecho dos estomas, levando a uma diminuição no rácio de CO_2 interior da folha/ CO_2 no ar, que conduz a um aumento do

valor de $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas (Iacumin et al., 2009; Portarena et al., 2017). Em princípio tem de se assumir que qualquer variável ambiental que exerça stresse hídrico na planta e consequentemente afete a sua condutância estomatal ou taxa de assimilação terá alguma influência no $\delta^{13}\text{C}$ dos produtos da fotossíntese (Spangenberg, 2016).

Como referido anteriormente, o $\delta^{13}\text{C}$ nas folhas das plantas depende do fracionamento causado pela difusão, do fracionamento associado à fixação do dióxido de carbono e do rácio entre as concentrações de CO_2 intracelular e ambiental que estão diretamente relacionados com os parâmetros climáticos e geográficos. Por outro lado, o $\delta^{13}\text{C}$ é influenciado pela eficiência do uso da água por parte da planta (Marshall et al., 2007) e esta característica está correlacionada com a variedade da planta (Bramley, Turner & Siddique, 2013).

A eficiência do uso da água ou a eficiência da transpiração, descreve a relação de troca intrínseca entre a fixação do carbono e a perda de água que ocorre nas plantas em regiões mais secas devido à evaporação da água dos tecidos intersticiais das folhas sempre que os estomas abrem para a aquisição de CO_2 . Esta eficiência no uso da água influencia a razão isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ pois cada vez que estomas fecham para impedir a saída de vapor de água também impedem a entrada de CO_2 . A diminuição da condutância dos estomas reduz o fluxo de ambos os gases, mas não proporcionalmente. A redução da condutância dos estomas é proporcional à transpiração de modo a que o ar no interior da folha esteja saturado com o vapor de água, mas a diminuição da taxa fotossintética não decresce na mesma proporção, o consumo de CO_2 para a fotossíntese continua a um ritmo elevado apesar da diminuição da difusão para o interior da folha tenha diminuído. Deste modo o CO_2 no interior da folha vai diminuindo e ficando progressivamente enriquecido no isótopo mais pesado, normalmente discriminado na carboxilação enzimática, conduzindo a produtos fotossintéticos igualmente enriquecidos em ^{13}C (Ghosh & Brand, 2003; Marshall et al., 2007).

No período compreendido entre o Verão e o Outono, período de maturação das azeitonas, as condições climatéricas mudam drasticamente. Passa-se de uma situação em que a utilização de CO_2 está limitada (devido à diminuição da condutância dos estomas) para uma situação em que a difusão do CO_2 é favorecida (devido à abertura dos estomas em resposta ao aumento da água disponível). Esta situação implica que o fracionamento associado à atividade da RuBisCO seja mais notório a partir do momento

em que a planta tem mais CO₂ à disposição. Esta eficiência do uso da água é afetada tanto por fatores ambientais como por fatores inerentes à própria planta, que podem ser diferentes conforme a variedade (Bramley et al., 2013).

De entre os valores médios das razões isotópicas foi o $\delta^2\text{H}$ que mais variou entre regiões (tabela 5 e figura 25), com uma amplitude total de 26,2‰ (-156,9 a -130,7‰). Esta amplitude de valores é expectável quando se determina o $\delta^2\text{H}$, embora o isótopo mais pesado tenha uma abundância natural relativamente menor que os outros isótopos estáveis aqui considerados (¹⁸O e ¹³C) a grande diferença nos pesos atômicos dos 2 isótopos (1,0079 para o ¹H e 2,01 para o ²H) comparativamente aos outros elementos, levam a propriedades físicas marcadamente diferentes, incluindo as taxas de reação. Isto implica que os processos físicos associados ao ciclo da água e os processos biológicos envolvendo reações catalisadas por enzimas, podem produzir uma variação na abundância natural do ²H muito maior (Kelly & Rhodes, 2002).

Como se pode observar na tabela 5 o valor médio de $\delta^2\text{H}$ no Alentejo foi de -138,1‰ enquanto em Trás-os-Montes foi de -149,7‰, valores consistentes com a bibliografia em que os valores isotópicos a norte são inferiores. Bontempo et al. (2009) verificaram um empobrecimento em $\delta^2\text{H}$ ao longo da costa Adriática em Itália, que atribuíram ao efeito continental e à composição isotópica da chuva, considerando que o $\delta^2\text{H}$ é determinante na distinção entre as duas costas do país.

Os valores de $\delta^2\text{H}$ nos azeites estão relacionados com a composição isotópica da água, nomeadamente da precipitação (que tem uma maior correlação com a localização onde se dá essa precipitação do que propriamente com a quantidade de precipitação) (Camin et al., 2010b), com valores mais elevados nas regiões de menor altitude, mais próximas da costa e clima mais quente (como é o caso da região Alentejo) e com valores mais baixos nas regiões localizadas a maior altitude, mais afastadas do oceano e com clima mais frio (Muhammad et al., 2018).

Contrariamente ao verificado com o $\delta^{13}\text{C}$, não existe indicação de que as variedades tenham influência nas razões isotópicas de $\delta^2\text{H}$. Observando a figura 27, verifica-se que as amostras da variedade Cobrançosa (comum em ambas as regiões) são enriquecidas no isótopo mais pesado na região Alentejo, com um valor médio de $\delta^2\text{H}$ de -138,5‰ enquanto o valor médio para a variedade Cobrançosa em Trás-os-Montes foi de -

148,2‰. Este enriquecimento isotópico deve-se à composição isotópica da chuva, considerando que os átomos de hidrogénio e oxigénio provenientes da água são incorporados nos produtos fotossintéticos e são posteriormente usados na biossíntese dos lípidos e apesar de ocorrer fracionamento isotópico durante estes processos bioquímicos, a assinatura isotópica do hidrogénio que prevalece é a da água meteórica de cada localização (Camin et al., 2010b; Camin et al., 2010c; Mihailova et al., 2015). Assim, a variação isotópica na água é essencialmente devida ao fracionamento associado às mudanças de fase durante o ciclo hidrológico. Ambos os efeitos isotópicos, de equilíbrio e cinético, são importantes dependendo onde e como as mudanças de fase ocorrem (Cappa, 2003; McGuire & McDonnell, 2007).

A diferença entre regiões que se observa nos valores médios do $\delta^2\text{H}$ não é evidente nos valores de $\delta^{18}\text{O}$, esta diferença entre os dois parâmetros isotópicos pode ser explicada pelo fato do hidrogénio nas plantas, cuja origem é exclusivamente da água captada pelas raízes, ter uma composição em $\delta^2\text{H}$ muito semelhante à da chuva, enquanto o oxigénio tem origem na fonte de água mas também no CO_2 e O_2 atmosférico (Bontempo et al., 2009), ou seja, o $\delta^{18}\text{O}$ reflete a composição isotópica da água no solo, o enriquecimento devido à transpiração nas folhas e as trocas isotópicas entre as moléculas orgânicas e a água na planta (Barbour, 2007; Schmidt et al., 2001).

Por outro lado, a diferença de massa entre os isótopos ^{16}O e ^{18}O (32 e 34 respetivamente) é relativamente pequena o que leva a que o fracionamento devido aos efeitos isotópicos seja menos visível, comparativamente ao hidrogénio. Neste estudo o valor médio de $\delta^{18}\text{O}$ é semelhante em ambas as regiões embora ligeiramente superior mais a sul tal como o $\delta^2\text{H}$ (22,6‰ em Trás-os-Montes e 23,0‰ no Alentejo). Na região Alentejo registaram-se valores entre os 21,2‰ e 25,9‰, uma amplitude superior (4,7‰) à verificada em Trás-os-Montes (2,1‰).

5.2.2 - ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

A determinação de razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ em azeites provenientes de várias localizações e com diferentes características climáticas origina uma grande quantidade de dados o que torna difícil reconhecer padrões ou como se relacionam as diversas variáveis umas com as outras, pelo que diversos métodos de análise multivariada foram aplicados com o objetivo de analisar todas as variáveis consideradas em simultâneo, nomeadamente a Análise de Componentes Principais (ACP), a Análise de Clusters (AC), a Análise Discriminante (AD) e a Regressão Linear Múltipla (RLM).

Os principais objetivos na aplicação de métodos multivariados na química analítica focam-se em agrupar e classificar objetos (amostras, compostos ou materiais) assim como na criação de modelos que verifiquem as relações entre dados analíticos diferentes. Inicialmente é necessário fazer um processamento prévio dos dados; a matriz de correlação é um pré-requisito, uma vez que o propósito da aplicação destes métodos, como a ACP, é a redução da dimensionalidade, que depende da correlação entre as variáveis, se não houver algum tipo de correlação entre as variáveis tornando alguma da informação redundante, não faz sentido aplicar técnicas de redução de dimensionalidade (Alonso-Salces et al., 2010; Miller & Miller, 2000).

Definiram-se então as características amostrais para o caso bivariado, ou seja, características que permitem comparar as variáveis duas a duas, de modo a avaliar o grau de associação entre elas. Para quantificar essa associação utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, que utiliza a covariância para quantificar a associação linear entre 2 variáveis. O coeficiente de Pearson foi calculado entre a composição isotópica e os dados geográficos e climáticos para averiguar a existência de correlações entre pares de variáveis. Os valores calculados para este parâmetro foram comparados com o valor crítico com uma certeza de 95%.

A Tabela 7 mostra a correlação entre cada par de variáveis. Estes coeficientes de correlação variam entre -1 e +1 e quantificam a relação linear entre 2 variáveis. Para cada par é calculado o valor de *P* que mede a significância estatística da correlação estimada (a vermelho quando não existe significância estatística, a amarelo quando é significativa e a verde quando é altamente significativa). Valores positivos

correspondem a uma correlação positiva e os valores negativos a uma correlação negativa.

Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$	Latitude	Longitude	Altitude	Precipitação	Temperatura
$\delta^2\text{H}$	-0,1643 ^{n.s.}							
$\delta^{18}\text{O}$	0,1717 ^{n.s.}	0,3598*						
Latitude	0,3341*	-0,8199**	-0,2071 ^{n.s.}					
Longitude	-0,5805**	0,5064**	0,2392 ^{n.s.}	-0,6625**				
Altitude	0,4574**	-0,6189**	-0,1135 ^{n.s.}	0,7336**	-0,7954**			
Precipitação	-0,3216*	0,4891**	0,1710 ^{n.s.}	-0,6914**	0,7418**	-0,8425**		
Temperatura	-0,2209 ^{n.s.}	0,7609**	0,1125 ^{n.s.}	-0,9286**	0,4820**	-0,6728**	0,7288**	
Distância do oceano	0,4954**	-0,1666 ^{n.s.}	-0,2319 ^{n.s.}	0,2584 ^{n.s.}	-0,8508**	0,5494**	-0,4431**	0,0153 ^{n.s.}

^{n.s.} Não significativo ($P>0,05$)

* Significativo ($0,05<P<0,01$)

** Altamente significativo ($P<0,01$)

Pela observação dos coeficientes de correlação mostrados na tabela 7, verifica-se que para os valores da composição isotópica, tanto o $\delta^{13}\text{C}$ como o $\delta^2\text{H}$ estão correlacionados com alguns dos parâmetros geográficos enquanto o $\delta^{18}\text{O}$ não apresenta qualquer correlação significativa com nenhum dos parâmetros considerados ($P>0,05$). Relativamente às correlações entre si, o $\delta^{18}\text{O}$ e o $\delta^2\text{H}$ apresentam uma correlação significativa ($P<0,05$) mas não estão correlacionados com o $\delta^{13}\text{C}$.

O $\delta^{13}\text{C}$ tem uma correlação ($P<0,05$) negativa com a precipitação e positiva com a Latitude, em concordância com o fato de no ano de produção considerado ter chovido mais na região Alentejo, mais a sul. Chiocchini et al. (2016) relacionaram as razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ com a precipitação e temperatura ao longo de 3 anos em localizações específicas e concluíram que em um dos anos o $\delta^{13}\text{C}$ não estava significativamente correlacionado com as variáveis climáticas consideradas e nos outros 2 anos estava positivamente correlacionado com a temperatura e negativamente com a precipitação. A Altitude e a Distância ao oceano também estão correlacionadas positivamente com o $\delta^{13}\text{C}$ com valores de R^2 de 0,4574 e 0,4954 respetivamente, enquanto a Longitude está correlacionada negativamente ($R^2=-0,5805$). Estas correlações não coincidem com o descrito na bibliografia (Portarena et al., 2014), só a correlação entre a precipitação e o $\delta^{13}\text{C}$ é igualmente negativa, o que se pode dever ao fato de neste caso a precipitação estar negativamente correlacionada com a Latitude ($R^2=-0,6914$) e com a Altitude ($R^2=-0,8425$) e positivamente com a Longitude ($R^2=0,7418$). Relativamente à temperatura a correlação não é significativa ($P>0,05$) o que é corroborado por Iacumin et al. (2009).

O $\delta^2\text{H}$ está, como seria de esperar, altamente correlacionado com a Latitude, Longitude, Altitude, Temperatura e Precipitação, sendo que o coeficiente de correlação com a Latitude superior a 0,8. A correlação negativa com a Latitude e Altitude evidencia o empobrecimento no isótopo mais pesado nas localizações mais a norte, na região de Trás-os-Montes. Como se observa na tabela 7 o $\delta^2\text{H}$ está correlacionado com todas as variáveis com exceção da Distância ao Oceano enquanto o $\delta^{13}\text{C}$ está mais correlacionado com a Distância ao oceano, Longitude e Altitude e em menor escala com a Latitude e Precipitação. Relativamente ao $\delta^{18}\text{O}$ não existe uma correlação significativa com nenhuma das outras variáveis com exceção do $\delta^2\text{H}$, o que indica que pode não ser um parâmetro relevante para a distinção geográfica das amostras, principalmente em anos que as condições climáticas não são as expectáveis. Relativamente à correlação das diferentes razões isotópicas entre si, só é significativa entre o $\delta^2\text{H}$ e o $\delta^{18}\text{O}$.

5.2.2.1 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Como se observa na Tabela 7, existem variáveis correlacionadas umas com as outras, o que implica que alguma da informação fornecida pelos dados é redundante. Deste modo é importante diminuir o número de variáveis, sem perder informação. A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método exploratório de análise de dados multivariados que, por um lado, permite a visualização dos dados multivariados, por outro reduz a quantidade de dados sem perda significativa da informação neles contida, ou seja, transforma um conjunto de variáveis correlacionadas num conjunto de novas variáveis não correlacionadas, denominadas componentes principais (CP), que são uma combinação linear das variáveis originais e com a mesma dimensão (Abdi & Williams, 2010; Bajoub et al., 2017; Gomes, 2013). Os modelos lineares multivariados da ACP desenvolvem-se usando vetores de base ortogonal (vetores próprios ou *eigenvectors*), as CP, que modelam a variação estatisticamente significativa dos dados (Gemperline, 2006; Miller & Miller, 2000).

A ACP tenta representar a estrutura multidimensional dos dados da melhor forma. A direção que melhor descreve a distância relativa entre objetos é a direção com a máxima variância. Esta direção é a primeira componente principal (CP1). A segunda

componente principal (CP2) é ortogonal da CP1 e tem a segunda maior variância possível (Berrueta, Alonso-Salces & Heberger, 2007; Miller & Miller, 2000; Voncina, 2009).

A ACP é equivalente à rotação dos eixos originais de modo a que a CP1 esteja na direção da máxima variância. Em termos matemáticos as componentes principais são os vetores próprios (*eigenvectors*) da matriz de correlação amostral. Correspondente a cada componente principal está um valor próprio (*eigenvalue*) (tabela 8) que nos dá a quantidade da variância no conjunto de dados que é explicada por essa componente principal (Miller & Miller, 2000). A correlação entre as variáveis originais e as componentes principais designa-se por *loading* e indica como as variáveis originais

Tabela 8 - Valores próprios e proporção de variância explicada pelas componentes

Componente	Valores próprios	Percentagem da variância	Percentagem acumulada
1	5,0196	55,77	55,77
2	1,6278	18,09	73,86
3	1,1551	12,83	86,69
4	0,5588	6,21	92,90
5	0,3283	3,65	96,55
6	0,1933	2,15	98,70
7	0,0891	0,99	99,69
8	0,0271	0,30	99,99
9	0,0010	0,01	100,00

influenciam a formação das componentes principais (Le Bot et al., 2011) (tabela 9). Assim sendo, *loadings* próximos de 1 indicam que essa variável é importante na formação da componente principal, enquanto *loadings* próximos de 0 indicam que a variável não é importante na formação da componente principal. Os *loadings* são significantes se forem maiores que 0,3 em valor absoluto (Gomes, 2013).

Como já referido anteriormente, este estudo tem por base 38 amostras de azeite e 9 variáveis correspondentes a razões isotópicas e características geográficas e climáticas. Efetuou-se a ACP com o intuito de a partir do conjunto de 9 variáveis correlacionadas (tabela 7) obter um novo conjunto de variáveis não correlacionadas que expliquem uma percentagem significativa da variabilidade dos dados.

Para decidir relativamente ao número de componentes a reter considera-se a proporção de variância explicada pelas componentes e os valores próprios da matriz de correlações amostral, como se pode observar na tabela 8. Neste caso a componente principal 1 (CP1) explica aproximadamente 56% da variabilidade total dos dados, a componente principal 2 (CP2) explica 18% da variabilidade total não explicada pela

componente 1 e assim sucessivamente. Para explicar pelo menos 80% da variância dever-se-ia considerar as 3 primeiras componentes, que explicam 86,7% da variabilidade total dos dados originais. Outro critério para a escolha das componentes a considerar são os valores próprios que devem ser superiores a 1 (Gomes, 2013), pelo que, de acordo com a tabela 8, se devem reter as primeiras 3 componentes. Neste caso, para facilitar a interpretação gráfica, utilizaram-se as primeiras 2 componentes que por si só explicam aproximadamente 74% da variância dos dados. Deste modo reduzindo a dimensionalidade de 9 para 2.

A tabela 9 mostra os *loadings* das componentes principais para as 9 variáveis. Ao observar os *loadings* mais elevados, em valor absoluto, para cada variável (assinalados a verde) pode-se perceber quais as variáveis mais importantes para a formação de cada componente. Neste caso as variáveis que mais contribuíram para a primeira componente foram o $\delta^2\text{H}$, a Latitude, a Longitude, a Altitude, a Precipitação e a Temperatura. Tendo em conta que a primeira componente principal é a responsável pela maior variabilidade nos dados, pode-se assumir que estas são as variáveis mais importantes quando se pretende relacionar as razões isotópicas com as características climáticas e geográficas de uma determinada região. Para a segunda componente foram o $\delta^{13}\text{C}$, o $\delta^2\text{H}$, a Longitude, a Temperatura e a Distância ao oceano. Considerando os *loadings* que têm um valor absoluto superior a 0,3 pode-se observar que todas as variáveis à exceção do $\delta^{18}\text{O}$ são determinantes na formação das duas primeiras componentes. O $\delta^{18}\text{O}$ é a variável com maior peso na componente 3, ou seja, das três razões isotópicas é a que menos contribui para distinguir as amostras de azeite (a

Tabela 9 - *Loadings* das componentes principais

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
$\delta^{13}\text{C}$	0,2271	0,4379	-0,3474
$\delta^2\text{H}$	-0,3383	0,3563	-0,1093
$\delta^{18}\text{O}$	-0,1172	0,1484	-0,8349
Latitude	0,3982	-0,2638	-0,0966
Longitude	-0,3961	-0,3081	-0,1157
Altitude	0,4072	0,0662	-0,0878
Precipitação	-0,3839	0,0089	0,0527
Temperatura	-0,3561	0,4113	0,2288
Distância do oceano	0,2548	0,5667	0,2912

componente 3 só explica 12,8% da variabilidade dos dados), sendo que a que mais contribui é o $\delta^2\text{H}$ que é a única razão isotópica que contribui para a primeira componente principal.

Na figura 28 estão representados graficamente os *loadings* das 2 primeiras componentes, de onde se pode observar a importância das variáveis já referida na tabela 7, em que os *loadings* mais afastados da origem são os que mais contribuem para a respetiva componente. Nesta representação gráfica também se pode deduzir a correlação entre as variáveis através do ângulo dos vetores representados, assim, quanto menor o ângulo maior a correlação e *loadings* opostos estão inversamente correlacionados. Deste modo pode-se observar que a Distância ao oceano está muito correlacionada com o $\delta^{13}\text{C}$ e que ambas as variáveis contribuíram para a segunda componente principal. Assim como a Temperatura e o $\delta^2\text{H}$ estão muito correlacionados e em sentido inverso da latitude, todas com muito peso na CP1. O $\delta^{18}\text{O}$, embora correlacionado com o $\delta^2\text{H}$ e a Temperatura, tem um peso muito menor, aliás, como já referido, pode-se observar que esta é a variável com menor peso nas 2 primeiras Componentes Principais. De salientar ainda que a Precipitação e a Altitude só contribuem para a CP1 que só por si representa 55,8% da variabilidade dos dados totais.

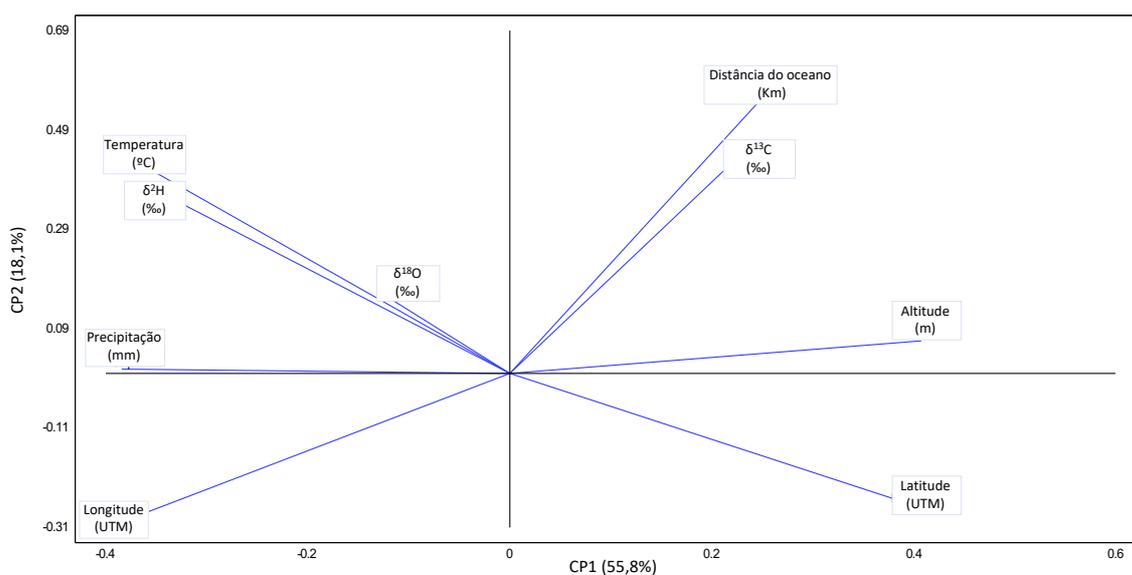


Figura 28 – Representação gráfica dos loadings das 2 primeiras componentes principais

5.2.2.2 - ANÁLISE DE CLUSTERS (AC)

A Análise de Clusters é uma análise de dados exploratória normalmente usada para classificação ou caracterização. Permite agrupar amostras com base nas suas semelhanças ou diferenças. Este tipo de análise utiliza toda a informação ou variância dos dados originais, em que o ponto de partida é a matriz de proximidade, que contém as distâncias entre cada par de objetos possível de estabelecer (Voncina, 2009).

Um dos objetivos da análise de clusters é reduzir a distância dentro dos grupos e aumentar a distância entre os grupos. Existem vários métodos para obter estes grupos que podem ser hierárquicos ou não hierárquicos, neste caso utilizou-se um método hierárquico, o que significa que uma vez que um objeto é atribuído a um grupo o processo não pode ser revertido. Este processo inicia-se considerando cada *cluster* com tamanho 1 e compara as distâncias entre clusters, os dois pontos mais perto um do outro formam um novo cluster. As distâncias são novamente comparadas e novamente se combinam os 2 clusters mais perto. Este processo é repetido até que estejam agrupados todos os pontos e o resultado é uma árvore hierárquica denominada dendrograma (Ares, 2014; Messai, Farman, Sarraj-Laabidi, Hammami-Semmar & Semmar, 2016; Miller & Miller, 2000).

Na figura 29 observa-se o dendrograma obtido através método hierárquico utilizando como critério de agregação “*Nearest Neighbour*” (ou “Single Linkage”) usando como medida entre clusters o quadrado da distância euclidiana. Neste procedimento criou-se um cluster a partir das 38 amostras. Os clusters, grupos de variáveis com

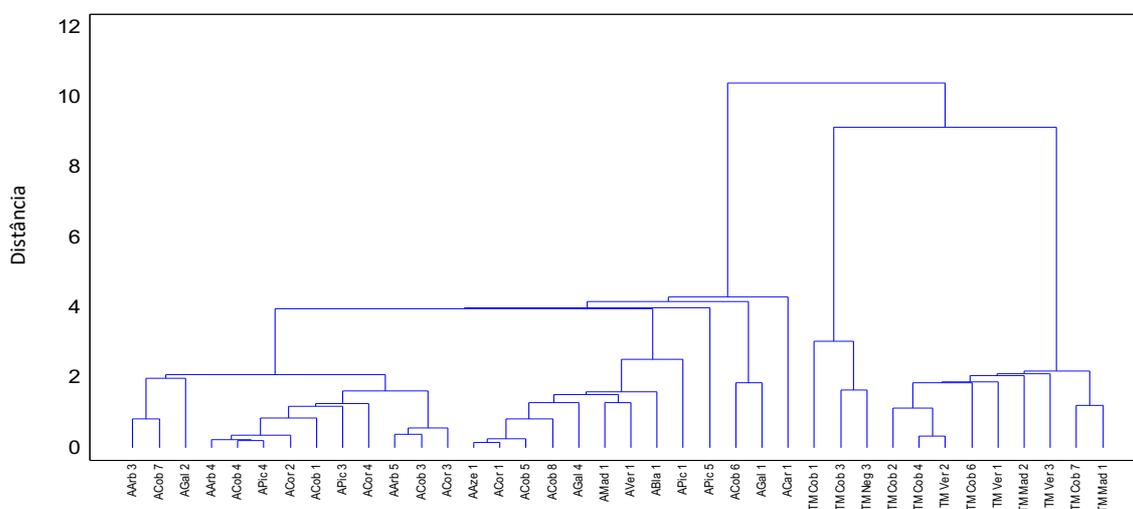


Figura 29 – Dendrograma para a amostra global

características semelhantes, começam a formar-se com cada variável num grupo separado, combinando em seguida as duas variáveis que se encontram mais perto.

A observação do dendrograma das observações (figura 29) mostra 2 clusters distintos para as amostras provenientes de Trás-os-Montes e Alentejo evidenciando a ligação entre as razões isotópicas e as variáveis geográficas e climáticas. Na figura 30 pode-se observar como a semelhança (distância) entre as variáveis permitiu agrupar os clusters acima mencionados.

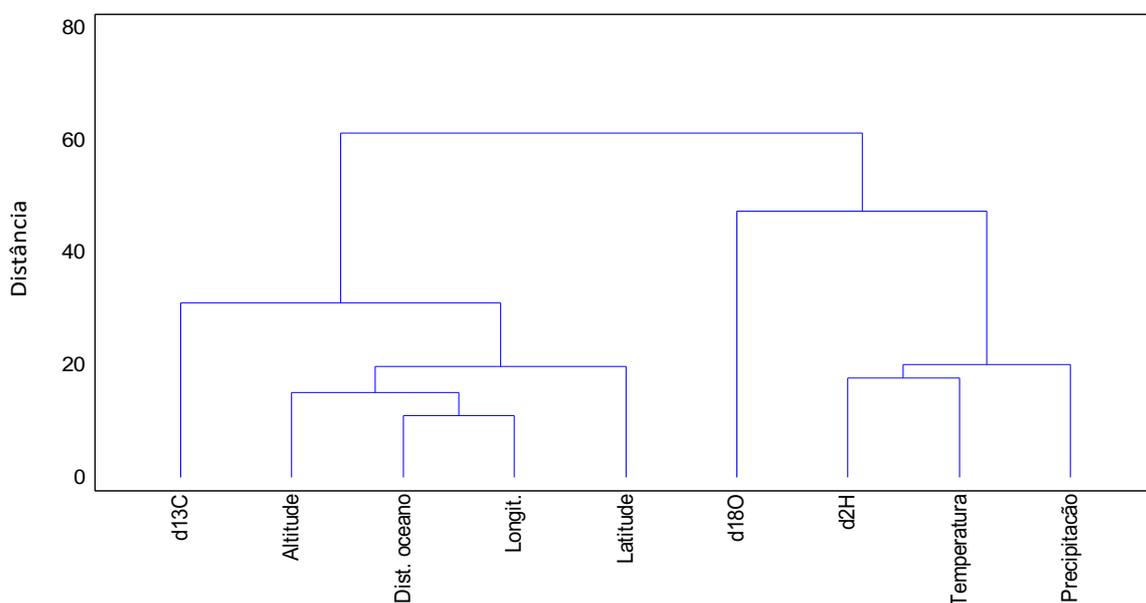


Figura 30 - Dendrograma das variáveis

Neste dendrograma (figura 30) verifica-se que as variáveis que formam o primeiro cluster são a Distância ao oceano e a Longitude, seguida da Altitude e da Latitude. Este cluster juntamente com a razão isotópica $\delta^{13}\text{C}$ permitem distinguir as amostras provenientes do Alentejo (figura 29). Por outro lado, as amostras provenientes de Trás-os-Montes são agrupadas com base nas semelhanças (menor distância) entre o $\delta^2\text{H}$ e a Temperatura seguidos da Precipitação. Esta proximidade já tinha sido observada na ACP, tal como o fato do $\delta^{18}\text{O}$ ser a variável mais distantes de todos os outros clusters, mas mesmo assim dentro do cluster que agrupa as amostras de Trás-os-Montes.

5.2.2.3 - ANÁLISE DISCRIMINANTE (AD)

As análises exploratórias de dados utilizadas até agora, nomeadamente a ACP e a AC, analisaram os dados multivariados sem usar diretamente a informação sobre a que classe (grupo) as amostras pertencem, ou seja, os grupos são agregados sem conhecimento prévio dos mesmos (métodos de aprendizagem não supervisionada). Embora estas técnicas de mapear e agrupar os dados sejam ferramentas poderosas para descobrir relações entre grandes conjuntos de dados multivariados, normalmente não são suficientes para desenvolver uma regra que permita a classificação dos objetos. No entanto, em última análise, o objetivo final do estudo de reconhecimento de padrões é desenvolver uma regra de classificação que possa prever com precisão a que classe pertence uma amostra desconhecida. Neste caso, conseguiremos prever com precisão a que região pertence uma amostras de AVE de origem desconhecida com base nas suas razões isotópicas?

Os métodos utilizados anteriormente permitiam verificar se os objetos se inseriam num determinado grupo sem conhecimento prévio dos grupos exetáveis. No entanto é possível utilizar objetos que se sabe a que grupo pertencem (chamados objetos de aprendizagem) para encontra uma função que permita colocar um objeto desconhecido dentro do grupo correto (Miller & Miller, 2000), ou seja, a Análise Discriminante (AD) permite posteriormente classificar amostras desconhecidas após verificação da possível diferenciação de amostras de origem conhecida.

Em contraste com a ACP, que determina as variáveis latentes responsáveis pelas semelhanças nos dados, a Análise Discriminante (AD) determina as variáveis latentes que melhor explicam as diferenças entre os dados pertencentes a classes pré-definidas (Granato & Ares, 2014). A análise discriminante é assim um método paramétrico que se foca em encontrar as fronteiras ideais entre diferentes classes de objetos. Tal como a análise de componentes principais, a análise discriminante permite a redução da informação, no entanto este método procura as direções espaciais que consigam uma máxima separação entre diferentes classes e utiliza a distância Euclidiana para classificar amostras desconhecidas (Gómez-Caravaca et al., 2016). Esta classificação é uma classificação supervisionada, ao contrário dos algoritmos de agregação não supervisionados da ACP e AC.

O ponto de partida para a Análise Discriminante é achar uma função linear que seja uma combinação linear das variáveis originais, de modo a que as n determinações para cada objeto sejam reduzidas de n dimensões a uma só dimensão de valor Y . Estas funções refletem a diferença entre grupos o mais possível, originando que objetos com valores de Y semelhantes pertencem ao mesmo grupo enquanto valores de Y diferentes pertencem a outro grupo. É deste modo que as Funções Lineares Discriminantes discriminam entre grupos (Miller & Miller, 2000).

Este método pretende estabelecer uma série de funções discriminantes que possam ajudar a prever o nível de determinada variável (por exemplo o nível de Elevação ou Influência oceânica) com base nos valores de outras variáveis quantitativas. Neste estudo foram usadas as 38 amostras de azeite das quais foram determinadas as razões isotópicas e de que são conhecidas as características geográficas e climáticas da sua proveniência. Com esta informação desenvolveram-se modelos com capacidade para discriminar relativamente a 2 níveis de Região (Alentejo e Trás-os-Montes) e 3 níveis de Temperatura, Elevação e de Influência o Oceânica que permitam classificar corretamente amostras desconhecidas. Ou seja, ao introduzir no modelo os valores das razões isotópicas de amostras de que se desconhece a proveniência, consegue-se classificar essa amostra relativamente à região, à temperatura, à elevação da zona e à distância ao oceano.

O primeiro passo na Análise Discriminante é estabelecer as classes ou níveis. No caso da Elevação, para considerar se as amostras são provenientes de uma zona a alta ou baixa altitude, estipularam-se 3 níveis de Elevação: Baixa (EB) se as amostras são provenientes de uma zona a menos de 200 m; Média (EM) se a altitude estiver entre os 200 e os 330 m; Alta (EA) se a altitude for superior a 330 m. As funções discriminantes foram calculadas com base nos valores das razões isotópicas de carbono, hidrogénio e oxigénio.

Os coeficientes das funções discriminantes permitem determinar as equações. A magnitude dos coeficientes da equação indica a importância de cada variável para discriminar entre grupos.

A primeira função discriminante (7) descreve 90,09% (valor de $P < 0,05$) da variância dos dados e a segunda função (8) 9,91% (tabela 10). Em conjunto as duas funções discriminantes são suficientes para explicar 100% da variância dos dados. A

discriminação dos dados em três classes pode ser representada graficamente usando as 2 funções uma contra a outra (figura 31). A sua interpretação permite identificar as variáveis que melhor discriminam entre grupos.

$$\text{Função 1}_{(Elevação)} = -0,5694 \delta^{13}\text{C} + 0,9794 \delta^2\text{H} - 0,0810 \delta^{18}\text{O} \quad (7)$$

$$\text{Função 2}_{(Elevação)} = -0,7025 \delta^{13}\text{C} - 0,4680 \delta^2\text{H} + 0,9841 \delta^{18}\text{O} \quad (8)$$

Tabela 10 - Funções discriminantes da Elevação em função das razões isotópicas

Função Discriminante (Elevação)	Valor próprio	Porcentagem Relativa	Valor P	Coeficientes		
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
Função 1 (Elevação)	1,73894	90,09	0	-0,5694	0,9794	-0,0810
Função 2 (Elevação)	0,19123	9,91	0,0511	-0,7025	-0,4680	0,9841

Observando o peso dos coeficientes da função, constata-se que o $\delta^2\text{H}$ é a variável com mais peso para discriminar quanto ao nível de elevação. Como se observa na figura 31 a função discriminante 1 consegue classificar e agrupar corretamente para os níveis de Elevação Alta e Baixa, enquanto a função 2 não consegue separar os diferentes níveis.

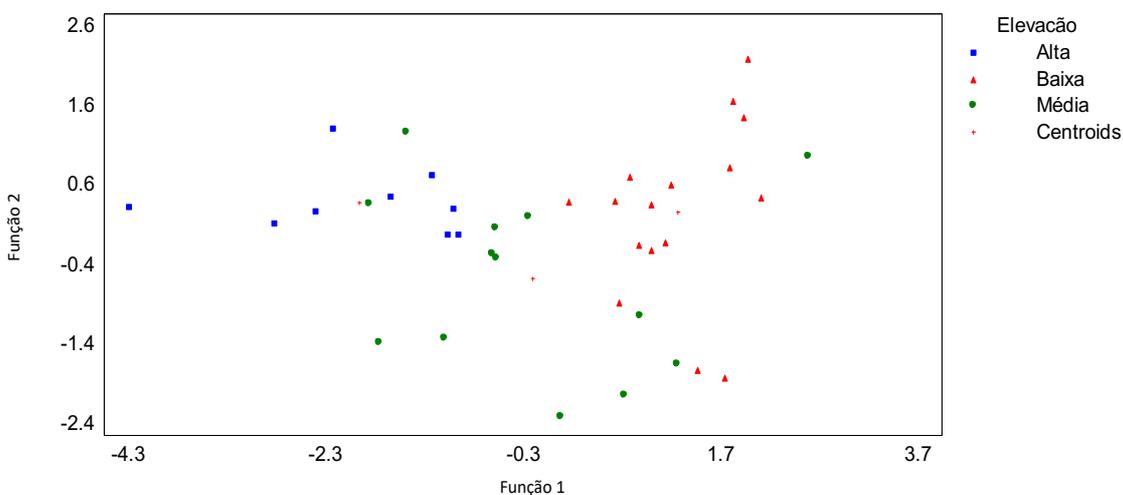


Figura 31 – Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de Elevação.

Para classificar ou prever em que grupo se inserem novas observações, existe uma função para cada nível de Elevação. Com estas funções obtém-se um valor (“pontuação”) para cada nível em função de dados isotópicos de novas observações, sendo o valor mais alto correspondente ao grupo onde se vai inserir a nova amostra. Neste caso as funções para estabelecer se uma nova amostra pertence a uma zona de Elevação Alta (9), Baixa (10) ou Média (11), utilizando os valores das razões isotópicas são as seguintes:

$$AE = - 2216,77 - 60,0925 \delta^{13}C + 55,3128 \delta^{18}O - 9,4681 \delta^2H \quad (9)$$

$$BE = - 2175,69 - 62,3615 \delta^{13}C + 54,9299 \delta^{18}O - 8,7749 \delta^2H \quad (10)$$

$$ME = - 2136,7 - 60,5121 \delta^{13}C + 54,2361 \delta^{18}O - 9,0021 \delta^2H \quad (11)$$

A função que gerar um valor absoluto maior corresponde ao grupo, ou seja, ao nível de Elevação a que pertence a nova observação. O modelo calculado com as funções discriminantes (9), (10) e (11) classificou corretamente 84,2% das amostras utilizadas (tabela 11).

Tabela 11 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de Elevação

Elevação	Tamanho do grupo	Elevação prevista		
		AE	BE	ME
AE	9	8	0	1
		88,89%	0,00%	11,11%
BE	16	0	14	2
		0,00%	87,50%	12,50%
ME	13	2	1	10
		15,38%	7,69%	76,92%
Percentagem de casos corretamente classificados: 84,21%				

Relativamente aos níveis de influência oceânica, estes foram calculados a partir da distância ao oceano, considerando que existe uma elevada influência oceânica nas amostras que distam do oceano menos que 120 Km, uma influência média entre 120 e 160 Km e que a influência oceânica é baixa para distâncias superiores a 160 km.

Observando a tabela 12 verifica-se que no caso da Influência oceânica a primeira função discriminante representa 85,54% da variabilidade dos dados ($P < 0,05$) e que a variável com mais peso para discriminar entre grupos é novamente o $\delta^2\text{H}$. No entanto neste caso também a função discriminante 2 é significativa ($P < 0,05$) e neste caso são as variáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ que têm mais peso a discriminar entre os diferentes níveis de Influência oceânica.

$$\text{Função 1 (Infl. Oceânica)} = - 0,5613 \delta^{13}\text{C} + 0,9106 \delta^2\text{H} - 0,0945 \delta^{18}\text{O} \quad (12)$$

$$\text{Função 2 (Infl. Oceânica)} = 0,8320 \delta^{13}\text{C} + 0,5474 \delta^2\text{H} - 0,8179 \delta^{18}\text{O} \quad (13)$$

Tabela 12 - Funções discriminantes da Influência oceânica em função das razões isotópicas

Função Discriminante (Infl. oceânica)	Valor próprio	Porcentagem Relativa	Valor p	Coeficientes		
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
Função 1 (Infl. oceânica)	1,6443	85,54	0	-0,5613	0,9106	0,0945
Função 2 (Infl. oceânica)	0,2780	14,46	0,0155	0,8320	0,5474	-0,8179

A representação gráfica (figura 32) que se obtém a partir das funções discriminantes mostra como a primeira função discriminante (12) foi capaz de discriminar entre as amostras de AVE sujeitas a uma média influência oceânica (MIO) das que tinham uma alta influência oceânica (AIO) enquanto as que se consideravam com uma baixa influência oceânica (BIO) não se conseguem separar. Esta situação pode dever-se ao fato das amostras de Trás-os-Montes se encontrarem a uma distância do oceano considerada média (alguma das amostras do Alentejo estão mais afastadas do oceano, nomeadamente as amostras da zona de Elvas).

As funções discriminantes para os diferentes níveis de influência oceânica permitem agrupar e classificar novas observações. Com base no modelo obtido, foram classificadas corretamente 84,21% das amostras (tabela13). O modelo classificou corretamente 80% das amostras consideradas como tendo alta influência oceânica ou baixa influência oceânica, no entanto classificou corretamente 92% das amostras que se considerou terem uma influência oceânica média, que como referido anteriormente são

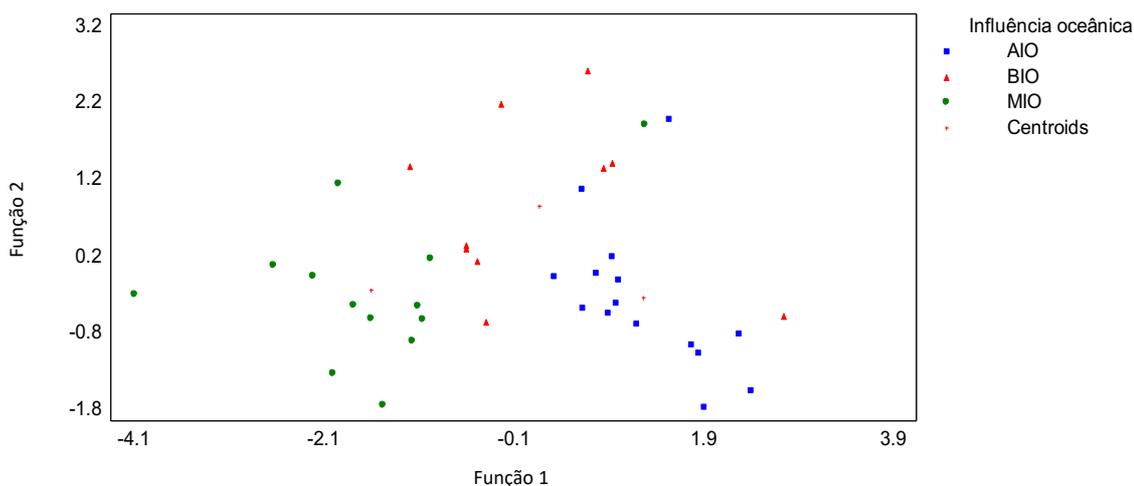


Figura 32 - Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de *Influência oceânica*.

essencialmente as amostras provenientes de Trás-os-Montes. Efetivamente, a amostra que foi classificada incorretamente (tabela 13) como BIO quando de fato era MIO, foi uma amostras da zona de Mourão que se encontra a uma distância do oceano semelhante às da região de Trás-os-Montes, mas que pertence à região Alentejo.

$$\text{AIO} = - 2344,11 - 72,2491 \delta^{13}\text{C} + 56,4914 \delta^{18}\text{O} - 8,73191 \delta^2\text{H} \quad (14)$$

$$\text{BIO} = - 2267,08 - 70,1243 \delta^{13}\text{C} + 55,4232 \delta^{18}\text{O} - 8,8075 \delta^2\text{H} \quad (15)$$

$$\text{MIO} = - 2349,54 - 70,0134 \delta^{13}\text{C} + 56,1429 \delta^{18}\text{O} - 9,2897 \delta^2\text{H} \quad (16)$$

Tabela 13 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de *Influência oceânica*

Influência oceânica	Tamanho do grupo	Influência oceânica prevista		
		AIO	BIO	MIO
AIO	15	12	3	0
		80,00%	20,00%	0,00%
BIO	10	1	8	1
		10,00%	80,00%	10,00%
MIO	13	0	1	12
		0,00%	7,69%	92,31%
Percentagem de casos corretamente classificados: 84,21%				

No caso da Temperatura estipulou-se que uma zona de temperatura elevada (TA) teria como temperatura média, para os meses entre Agosto e Dezembro, acima dos 19°C e uma zona caracterizada por temperaturas mais baixas (TB) valores menores que 16°C. Os valores de temperatura situados entre 16 e 19°C consideraram-se valores de temperatura média (TM). Do mesmo modo procedeu-se a uma análise discriminante para avaliar a capacidade do modelo distinguir e classificar quanto à temperatura da região de proveniência das amostras de AVE. A tabela 14 apresenta os valores próprios e coeficientes das 2 funções discriminantes (17) e (18) para os 3 níveis de temperatura. Mais uma vez a razão isotópica $\delta^2\text{H}$ é a que tem mais peso e a função 1 representa 95,5% da variação dos dados de temperatura, enquanto a função 2 não é significativa ($P>0,05$).

$$\text{Função 1}_{(Temperatura)} = -0,3363 \delta^{13}\text{C} + 1,0694 \delta^2\text{H} - 0,2721 \delta^{18}\text{O} \quad (17)$$

$$\text{Função 2}_{(Temperatura)} = 0,9564 \delta^{13}\text{C} + 0,2936 \delta^2\text{H} - 0,5991 \delta^{18}\text{O} \quad (18)$$

Tabela 14- – Funções discriminantes da Temperatura em função das razões isotópicas

Função Discriminante (Temperatura)	Valor próprio	Porcentagem Relativa	Valor P	Coeficientes		
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
Função 1 (Temperatura)	2,7778	95,51	0	-0,3363	1,0694	-0,2721
Função 2 (Temperatura)	0,1305	4,49	0,1242	0,9564	0,2936	-0,5991

Na figura 33 pode-se observar que a representação gráfica mais uma vez agrupa as amostras provenientes de zonas em que as temperaturas foram mais baixas. Quanto às temperaturas altas (TA) e temperaturas médias (TM) o modelo já não agrupa de maneira distinta. Observando a tabela 15, obtida a partir das classificações originadas pelas funções (19), (20) e (21), verifica-se que o modelo classificou corretamente 100% das amostras consideradas provenientes de baixas temperaturas (TB) e foi menos eficiente a classificar amostras de temperaturas altas (TA) e temperaturas médias (TM), em que só classificou corretamente 66,7 e 76,5% respetivamente. Neste caso, porém, o modelo ao diferenciar as amostras provenientes de zonas com temperaturas mais baixas,

consegue separar as amostras provenientes de Trás-os-Montes. As amostras em que se consideraram as temperaturas média e elevada, situam-se todas no Alentejo (tabela 1).

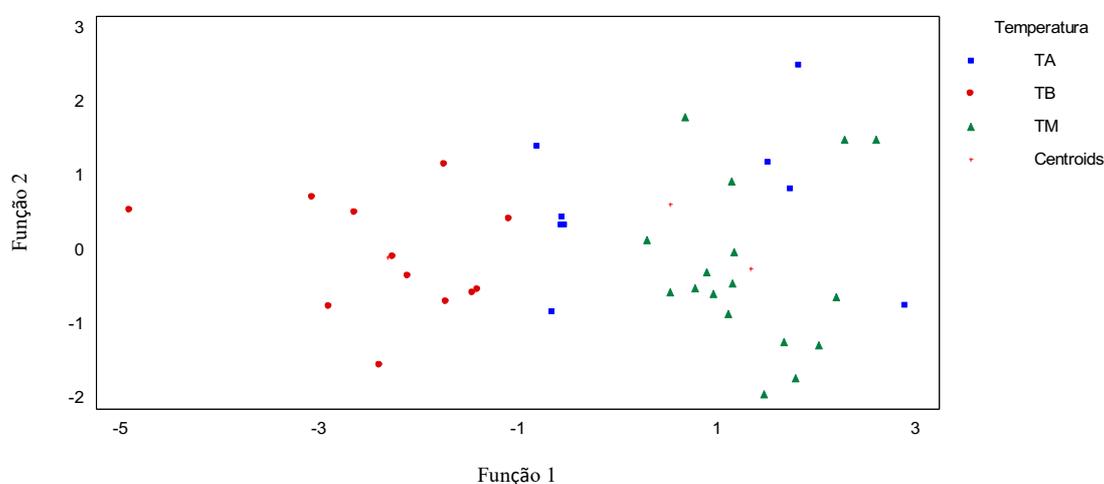


Figura 33 - Representação gráfica das funções discriminantes para 3 níveis de *Temperatura*

$$TA = - 2373,45 - 54,0160 \delta^{13}C + 54,2406 \delta^{18}O - 13,8343 \delta^2H \quad (19)$$

$$TB = - 2512,77 - 53,6686 \delta^{13}C + 55,3998 \delta^{18}O - 14,6861 \delta^2H \quad (20)$$

$$TM = - 2399,01 - 55,4054 \delta^{13}C + 54,5275 \delta^{18}O - 13,6741 \delta^2H \quad (21)$$

Tabela 15 - Percentagem de casos corretamente classificados pelo modelo para 3 níveis de *Temperatura*

Temperatura	Tamanho do grupo	Temperatura prevista		
		TA	TB	TM
TA	9	6	1	2
		66,67%	11,11%	22,22%
TB	12	0	12	0
		0,00%	100,00%	0,00%
TM	17	4	0	13
		23,53%	0,00%	76,47%
Percentagem de casos corretamente classificados: 81,58%				

Analisando as classificações obtidas pelas funções discriminantes relativamente à altitude, distância ao oceano e temperatura pode-se verificar que as características relacionadas com a região de Trás-os-Montes, como Alta Elevação, Influência Oceânica

Média e Temperatura Baixa, foram corretamente classificadas pelos modelos anteriores, havendo apenas 1 amostra mal classificada relativamente ao nível de Elevação e outra relativa à influência oceânica. Este é pois um modelo que pode discriminar entre amostras das 2 regiões em estudo em função das 3 variáveis preditivas, pelo que também se verificou se o modelo é eficiente usando as 2 regiões como 2 níveis de localização geográfica, desse modo obteve-se uma só função discriminante (22) em que também a magnitude do coeficiente do $\delta^2\text{H}$ é a que tem mais peso na discriminação entre as 2 regiões.

Tabela 16 - Função discriminante da Região em função das razões isotópicas

Função Discriminante (região)	Valor próprio	Percentagem Relativa	Valor P	Coeficientes		
				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
Função 1 (região)	2,4575	100	0	-0,1990	1,0864	-0,3454

$$\text{Função 1}_{(\text{região})} = -0,3454 \delta^{13}\text{C} + 1,0864 \delta^2\text{H} - 0,34541 \delta^{18}\text{O} \quad (22)$$

Como se observa na tabela 17 este modelo classificou corretamente 97,37% das amostras relativamente à região de proveniência com base nos valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$. Em comum, todos os modelos, têm o fato do $\delta^2\text{H}$ ser determinante para discriminar entre as amostras, sendo sempre o cociente com mais peso em todos os modelos.

Tabela 17 - Percentagem de casos corretamente classificado pelo modelo para 2 níveis de Região

Região	Tamanho do grupo	Região prevista	
		Alentejo	Trás-os-Montes
Alentejo	26	25	1
		96,15%	3,85%
Trás-os-Montes	12	0	12
		0,00%	100,00%
Percentagem de casos corretamente classificados: 97,37%			

5.2.2.4 - REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (RLM)

O modelo de regressão linear múltipla é uma técnica estatística, descritiva e inferencial, que permite a análise da relação entre uma variável dependente e um conjunto de variáveis independentes. As análises multivariadas efetuadas anteriormente demonstram a relação das razões isotópicas com as variáveis climáticas e geográficas, considerando esses resultados, pretende-se verificar se será possível determinar cada uma das variáveis dependentes (latitude, longitude, precipitação, altitude, distância ao oceano e temperatura) em função do conjunto de variáveis independentes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$). Neste estudo, pretende-se criar um modelo que permita inferir, por exemplo, a latitude e a longitude da origem do azeite em função das razões isotópicas do carbono, oxigênio e hidrogênio, e se terão todas as 3 razões isotópicas interesse para o modelo.

A tabela 18 apresenta um sumário dos modelos efetuados para cada uma das variáveis, com os respectivos coeficientes de correlação múltipla e resultados da análise de variância, nomeadamente a estatística de teste F e o valor P associado, que determina a significância de cada um dos modelos globalmente.

Tabela 18 - Coeficientes de determinação e análise de variância para os modelos de Regressão Linear Múltipla considerando todas as variáveis independentes

	Coeficientes de determinação		ANOVA	
	R^2	R^2_a	F	Valor P
Latitude	0,7151	0,6899	28,44	0,0000
Longitude	0,5481	0,5082	13,74	0,0000
Altitude	0,5138	0,4709	11,98	0,0000
Temperatura	0,6119	0,5777	17,87	0,0000
Precipitação	0,3024	0,2409	4,91	0,0061
Distância ao oceano	0,3511	0,2939	6,13	0,0019

R^2 - Coeficiente de determinação, R^2_a - Coeficiente de determinação ajustado, F – Estatística de teste para um nível de significância 0,05

Na Regressão Linear Múltipla, em que os modelos incluem mais do que uma variável independente, os coeficientes de determinação ajustados (R^2_a) são mais adequados na avaliação da qualidade de ajustamento dos modelos. Neste caso, relativamente ao modelo para determinar a Latitude, por exemplo, verifica-se que para um R^2_a de 0,6899

pode-se afirmar que 68,99% da variabilidade total dos valores da Latitude são explicados pelas variáveis independentes $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$.

Tabela 19 - Coeficientes de regressão com todas as variáveis

	Coeficientes da Regressão				
		B	Erro padrão	t	Valor P
Latitude	Constante	22,7123	8,1799	2,7766	0,0089
	$\delta^{18}\text{O}$	0,0702	0,1429	0,4913	0,6264
	$\delta^{13}\text{C}$	0,3279	0,1628	2,0143	0,0519
	$\delta^2\text{H}$	-0,1748	0,0219	-7,9633	0,0000
Longitude	Constante	1,0624	2,6464	0,4015	0,6906
	$\delta^{18}\text{O}$	0,0777	0,0462	1,6804	0,1021
	$\delta^{13}\text{C}$	-0,2451	0,0527	-4,6540	0,0000
	$\delta^2\text{H}$	0,0188	0,0071	2,6426	0,0123
Altitude	Constante	240,6020	1060,7000	0,2268	0,8219
	$\delta^{18}\text{O}$	4,2403	18,5305	0,2289	0,8204
	$\delta^{13}\text{C}$	60,4060	21,1078	2,8618	0,0072
	$\delta^2\text{H}$	-12,2845	2,8456	-4,3171	0,0001
Temperatura	Constante	52,8328	12,1632	4,3437	0,0001
	$\delta^{18}\text{O}$	-0,3050	0,2125	-1,4354	0,1603
	$\delta^{13}\text{C}$	-0,1260	0,2420	-0,5205	0,6061
	$\delta^2\text{H}$	0,2244	0,0326	6,8771	0,0000
Precipitação	Constante	237,3110	66,5227	3,5674	0,0011
	$\delta^{18}\text{O}$	0,4690	1,1622	0,4036	0,6890
	$\delta^{13}\text{C}$	-2,3221	1,3238	-1,7541	0,0884
	$\delta^2\text{H}$	0,4765	0,1785	2,6698	0,0116
Distância ao oceano	Constante	1468,7300	402,1980	3,6518	0,0009
	$\delta^{18}\text{O}$	-15,9386	7,0264	-2,2684	0,0298
	$\delta^{13}\text{C}$	31,1644	8,0037	3,8938	0,0004
	$\delta^2\text{H}$	0,3591	1,0790	0,3328	0,7413

Todos os modelos são significativos globalmente (valor $P < 0,05$), no entanto ao analisar a tabela 19 verifica-se que aos valores da estatística de teste para os coeficientes de regressão parciais (t) nem sempre está associado um valor $P < 0,05$, ou seja, nem todas as razões isotópicas são significativas para a elaboração do modelo, que

deverá ser simplificado de modo a considerar, para cada um dos modelos, apenas as razões isotópicas relevantes.

As tabelas 20 e 21 mostram os valores relativos à análise de regressão efetuada apenas com as variáveis independentes significativas para o modelo.

Tabela 20 - Coeficientes de determinação e análise de variância para os modelos de regressão linear considerando as variáveis independentes significativas

	Coeficientes de determinação		ANOVA	
	R ²	R ² _a	F	Valor P
Latitude	0,7131	0,6967	43,49	0,0000
Longitude	0,5105	0,4826	18,25	0,0000
Altitude	0,5130	0,4852	18,44	0,0000
Temperatura	0,6088	0,5865	27,24	0,0000
Precipitação	0,2393	0,2181	11,32	0,0018
Distância ao oceano	0,3490	0,3118	9,38	0,0005

Tabela 21 - Coeficientes de regressão e análise de variância para os modelos de regressão linear considerando as variáveis independentes significativas

		Coeficientes da Regressão			
		B	Erro padrão	t	Valor-P
Latitude	Constante	25,5205	5,7874	4,4097	0,0001
	δ ¹³ C	0,3479	0,1559	2,2324	0,0321
	δ ² H	-0,1704	0,0199	-8,5651	0,0000
Longitude	Constante	4,1701	1,9417	2,1476	0,0387
	δ ¹³ C	-0,2229	0,0523	-4,2627	0,0001
	δ ² H	0,0235	0,0067	3,5235	0,0012
Altitude	Constante	410,2180	748,3820	0,5481	0,5871
	δ ¹³ C	61,6174	20,1546	3,0572	0,0043
	δ ² H	-12,0245	2,5734	-4,6727	0,0000
Temperatura	Constante	47,5691	4,2389	11,2220	0,0000
	δ ² H	0,2102	0,0299	7,0356	0,0000
Precipitação	Constante	327,2900	23,2432	14,0811	0,0000
	δ ² H	0,5511	0,1638	3,3648	0,0018
Distância ao oceano	Constante	1377,1100	289,4530	4,7576	0,0000
	δ ¹⁸ O	-15,0050	6,3597	-2,3594	0,0240
	δ ¹³ C	30,5092	7,6585	3,9837	0,0003

Utilizando os coeficientes de regressão das variáveis significativas para o modelo obtiveram-se as seguintes equações:

$$\text{Latitude} = 25,5205 + 0,3479 \times \delta^{13}\text{C} - 0,1704 \times \delta^2\text{H} \quad (23)$$

$$\text{Longitude} = 4,1701 - 0,2229 \times \delta^{13}\text{C} + 0,0235 \times \delta^2\text{H} \quad (24)$$

$$\text{Altitude} = 410,2180 + 61,6174 \times \delta^{13}\text{C} - 12,0245 \times \delta^2\text{H} \quad (25)$$

$$\text{Temperatura} = 47,5691 + 0,2102 \times \delta^2\text{H} \quad (26)$$

$$\text{Precipitação} = 327,2900 + 0,5511 \times \delta^2\text{H} \quad (27)$$

$$\text{Distância do oceano} = 1377,11 - 15,005 \times \delta^{18}\text{O} + 30,5092 \times \delta^{13}\text{C} \quad (28)$$

A figura 34 mostra as representações gráficas dos valores observados vs valores previstos para cada um dos modelos usando os valores dos isótopos estáveis como preditores.

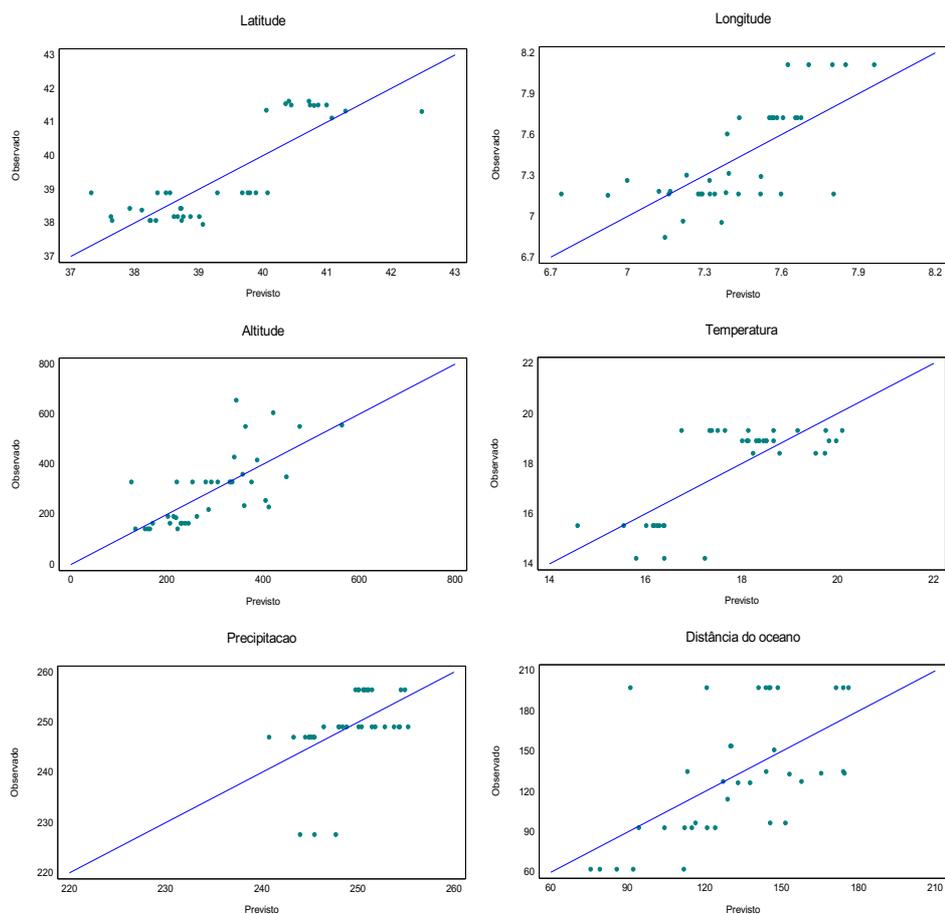


Figura 34 – Valores observados vs. Valores previstos para as variáveis geográficas e climáticas: Latitude, Longitude, Altitude, Temperatura, Precipitação e Distância ao Oceano

6 - CONCLUSÕES

O uso combinado de razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ com técnicas quimiométricas é uma ferramenta poderosa para estabelecer a origem geográfica de AVEs, que pode auxiliar no combate às fraudes a que o setor está sujeito em Portugal. Tanto quanto é possível saber, este foi o primeiro trabalho em que se usou a combinação da composição isotópica, em bulk, de AVE com uma análise estatística multivariada para demonstrar a existência de uma assinatura isotópica característica de AVEs portuguesas, com elevado potencial para estabelecer diferenças associadas com a sua Denominação de Origem Protegida.

Este trabalho tinha como objetivo relacionar a composição isotópica de ^{13}C , ^2H e ^{18}O de AVEs de diferentes variedades e provenientes de diversas localizações de Portugal Continental (nas regiões Alentejo e Trás-os-Montes) com as características edafoclimáticas dessas localizações (nomeadamente a Latitude, Longitude, Altitude, Distância ao Oceano, Temperatura e Precipitação) e avaliar se essas relações poderiam ser usadas para caracterizar e classificar os AVEs de acordo com a sua origem geográfica, identificando as razões isotópicas características de cada região e quais as variáveis que mais contribuíam para distinguir entre as 2 regiões.

Considerando os valores médios dos rácios isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ apresentados, verificou-se que existia de diferenças entre as amostras provenientes da região Alentejo e Trás-os-Montes. Entre as 2 regiões os valores médios das razões isotópicas de $\delta^2\text{H}$ foram os que mais variaram, com uma amplitude total de 26,2‰, com os valores inferiores registados na região mais a norte (Trás-os-Montes) em concordância com o descrito na bibliografia.

Relativamente à composição isotópica em ^{13}C esta é consistente com os valores das plantas C_3 , no entanto, estes valores foram ligeiramente superiores na região de Trás-os-Montes, o que não está de acordo com a bibliografia, que associa rácios isotópicos menores nas zonas situadas mais a norte, com temperaturas médias mais baixas e valores de precipitação superiores. Esta discrepância pode estar relacionada com o fato dos níveis de precipitação, durante os meses de maturação dos frutos, terem sido atípicos para as regiões consideradas, em que choveu mais na região mais a sul, deixando as amostras provenientes de Trás-os-Montes sujeitas a um maior stresse

hídrico. Este é um fator importante, pois induz o fecho dos estomas levando a uma diminuição do rácio de CO₂ interior da folha/CO₂ no ar que conduz a um aumento do ¹³C nas plantas e conseqüentemente no azeite.

Por outro lado, não se podem excluir as variedades como fator influente na composição isotópica devido às adaptações de cada variedade às condições climáticas, nomeadamente na eficiência do uso da água, e ao diferente perfil de ácidos gordos. A ação de complexos enzimáticos que conduzem a um fracionamento isotópico pode diferir entre variedades que tenham uma composição em ácidos gordos diferente. As diferentes variedades podem também exibir diferentes composições isotópicas pois começam a acumular óleo em períodos ligeiramente diferentes, mas que podem ser o suficiente para refletir possíveis diferenças climáticas, pois a maturação sucede numa altura em que a precipitação e a temperatura sofrem grandes variações com a passagem do Verão para o Outono.

A abordagem quimiométrica dos dados analíticos obtidos juntamente com as variáveis relacionadas com a localização das amostras permitiu distinguir os azeites provenientes de regiões diferentes e quais os fatores que mais influenciavam essa distribuição.

Observou-se que tanto o $\delta^{13}\text{C}$ como o $\delta^2\text{H}$ apresentam correlações com os parâmetros geográficos ambientais, enquanto o $\delta^{18}\text{O}$ não apresenta nenhuma correlação significativa ($P < 0,05$). O $\delta^{13}\text{C}$ apresenta uma correlação negativa com a precipitação e positiva com a latitude corroborando o fato de na época de produção aqui considerada ter chovido mais na região mais a sul (Alentejo). Mas foi o $\delta^2\text{H}$ que apresentou maior correlação com as variáveis geográficas e ambientais, com um coeficiente de correlação superior a 0,8 com a Latitude.

Na análise multivariada a utilização de métodos não supervisionados permitiu observar o peso que as variáveis geográficas e climáticas têm nas razões isotópicas e como as variáveis se relacionam entre si. A ACP permitiu, a partir do conjunto inicial das 9 variáveis em estudo, obter um novo conjunto de variáveis que explicavam uma percentagem significativa da variabilidade dos dados ($\approx 74\%$ para as 2 primeiras componentes principais), permitindo assim visualizar como as variáveis se relacionam entre si e quais as que mais contribuem para a variabilidade total dos dados. Assim observou-se que o $\delta^2\text{H}$ é a razão isotópica que mais contribui para a variabilidade dos

dados, enquanto o $\delta^{18}\text{O}$ a que menos contribui. Na análise dos dendrogramas obtidos pela AC observaram-se 2 clusters distintos para as amostras provenientes de Trás-os-Montes e Alentejo evidenciando a ligação entre as razões isotópicas e as variáveis geográficas e climáticas.

A aplicação de métodos supervisionados na análise estatística dos dados permitiu criar um modelo que permite classificar novas amostras de AVEs que se desconheça a sua origem geográfica e inferir sobre parâmetros ambientais com base nos valores da composição isotópica.

Na AD, as funções geradas pelo modelo permitem classificar corretamente 84,2% das amostras relativamente à Elevação e Distância ao Oceano e 81,6% relativamente à Temperatura. Este é um modelo que pode discriminar entre amostras das 2 regiões em função das três variáveis preditivas, com 97,4% das amostras corretamente classificadas. Analisando os coeficientes das funções discriminantes, verificou-se que a razão isotópica $\delta^2\text{H}$ é a variável com maior peso na discriminação das amostras.

A RLM gerou modelos estatisticamente significativos ($P < 0,05$), geográficos e climáticos, no entanto verificou-se que nem todas as razões isotópicas eram significativas para a elaboração do modelo. Assim, obteve-se um modelo simplificado que permite inferir quanto às variáveis dependentes (Latitude, Longitude, Altitude, Distância a o Oceano, Temperatura e Precipitação) em função do conjunto de variáveis dependentes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$) estatisticamente significativas.

Com este estudo foi possível inferir quanto à origem geográfica das amostras de AVE mesmo sem conhecimento das práticas agronómicas, nomeadamente a rega, o grau de maturação das azeitonas, condições de colheita, armazenamento, etc..

Este trabalho evidenciou a importância do rácio isotópico $\delta^2\text{H}$ na determinação da origem geográfica. Muitos dos estudos efetuados para estabelecer a relação da composição isotópica com a origem geográfica dos alimentos baseiam-se nos rácios isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$, no entanto, como se destacou neste estudo, estes valores ao serem influenciados pelas condições climáticas, que nem sempre seguem os padrões climáticos, podem ser insuficientes para a determinar a origem geográfica de AVEs. No entanto, o uso combinado das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ e técnicas de quimiometria podem estabelecer essa origem com mais precisão, podendo assim

desempenhar um papel fundamental na autenticidade e rastreabilidade de AVE com Denominação de Origem Protegida.

BIBLIOGRAFIA

- AAP. (2018). Casa do Azeite - Associação do Azeite de Portugal. <http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Dados-sector> (consultado em 13/11/2019)
- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 2(4), 433-459.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., . . . Walter, P. (2013). *Essential cell biology*: Garland Science.
- Alonso-Salces, R. M., Moreno-Rojas, J. M., Holland, M. V., Reniero, F., Guillou, C., & Heberger, K. (2010). Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ¹H NMR fingerprints and delta¹³C and delta²H data. *J Agric Food Chem*, 58(9), 5586-5596. doi:10.1021/jf903989b
- Angerosa, F., Bréas, O., Contento, S., Guillou, C., Reniero, F., & Sada, E. (1999). Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1013-1017.
- Angerosa, F., Camera, L., Cumitini, S., Gleixner, G., & Reniero, F. (1997). Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(8), 3044-3048.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31. doi:10.1016/s0021-9673(04)01298-1
- Aramendia, M. A., Marinas, A., Marinas, J. M., Moreno, J. M., Moalem, M., Rallo, L., & Urbano, F. J. (2007). Oxygen-18 measurement of Andalusian olive oils by continuous flow pyrolysis/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21(4), 487-496. doi:10.1002/rcm.2862

- Ares, G. (2014). Cluster analysis: Application in food science and technology. In *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (pp. 103-120): Wiley-Blackwell.
- Bajoub, A., Medina-Rodriguez, S., Gomez-Romero, M., Ajal el, A., Bagur-Gonzalez, M. G., Fernandez-Gutierrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2017). Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chem*, *215*, 245-255. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.140
- Barbour, M. M. (2007). Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Functional Plant Biology*, *34*(2). doi:10.1071/fp06228
- Barbour, M. M., Cernusak, L. A., & Farquhar, G. (2005). Factors affecting the oxygen isotope ratio of plant organic material. *Stable isotopes and biosphere-atmosphere interactions: Processes and biological controls*, 9-28.
- Barjol, J.-L. (2013). Introduction. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 1-17). Boston, MA: Springer US.
- Batista Silva, W., Daloso, D. M., Fernie, A. R., Nunes-Nesi, A., & Araujo, W. L. (2016). Can stable isotope mass spectrometry replace radiolabelled approaches in metabolic studies? *Plant Sci*, *249*, 59-69. doi:10.1016/j.plantsci.2016.05.011
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., . . . Breslin, P. A. S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, *437*, 45. doi:10.1038/437045a
- Benincasa, C., Lewis, J., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2007). Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Anal Chim Acta*, *585*(2), 366-370. doi:10.1016/j.aca.2006.12.040
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Heberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *J Chromatogr A*, *1158*(1-2), 196-214. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.024

- Bontempo, L., Camin, F., Larcher, R., Nicolini, G., Perini, M., & Rossmann, A. (2009). Coast and year effect on H, O and C stable isotope ratios of Tyrrhenian and Adriatic Italian olive oils. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *23*(7), 1043-1048. doi:10.1002/rcm.3968
- Boskou, D. (2008a). *Olive oil: minor constituents and health*: CRC Press.
- Boskou, D. (2008b). Phenolic compounds in olives and olive oil. In Dimitriou Boskou (Eds.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health*: CRC Press.
- Bramley, H., Turner, N. C., & Siddique, K. H. M. (2013). Water Use Efficiency. In *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops* (pp. 225-268).
- Brereton, R. G. (2007). *Applied chemometrics for scientists*: John Wiley & Sons.
- Brugnoli, E., & Farquhar, G. D. (2000). Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In *Photosynthesis: Physiology and metabolism* (pp. 399-434): Springer.
- Camin, F., Boner, M., Bontempo, L., Fahl-Hassek, C., Kelly, S. D., Riedl, J., & Rossmann, A. (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends in Food Science & Technology*, *61*, 176-187. doi:10.1016/j.tifs.2016.12.007
- Camin, F., Bontempo, L., Ziller, L., Piangiolino, C., & Morchio, G. (2010a). Stable isotope ratios of carbon and hydrogen to distinguish olive oil from shark squalene-squalane. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *24*(12), 1810-1816. doi:10.1002/rcm.4581
- Camin, F., Larcher, R., Nicolini, G., Bontempo, L., Bertoldi, D., Perini, M., . . . Hoogewerff, J. (2010b). Isotopic and elemental data for tracing the origin of European olive oils. *J Agric Food Chem*, *58*(1), 570-577. doi:10.1021/jf902814s
- Camin, F., Larcher, R., Perini, M., Bontempo, L., Bertoldi, D., Gagliano, G., . . . Versini, G. (2010c). Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry*, *118*(4), 901-909. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.059

- Campos, L. S. (2005). *Entender a Bioquímica, 4.ª Edição*: Escolar Editora.
- Cappa, C. D. (2003). Isotopic fractionation of water during evaporation. *Journal of Geophysical Research*, 108(D16). doi:10.1029/2003jd003597
- Carter, J., & Barwick, V. (2011). In (J. Carter & V. Barwick Eds.). *Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry, FIRMS*.
- Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., & Pezzi, V. (2013). Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 71-83. doi:10.1002/mnfr.201200503
- Charlebois, S., Schwab, A., Henn, R., & Huck, C. W. (2016). Food fraud: An exploratory study for measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on self-authentication intentions. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 211-218. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.003
- Chiocchini, F., Portarena, S., Ciolfi, M., Brugnoli, E., & Lauteri, M. (2016). Isoscapes of carbon and oxygen stable isotope compositions in tracing authenticity and geographical origin of Italian extra-virgin olive oils. *Food Chemistry*, 202, 291-301. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.146
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*, 23(2), 129-135. doi:10.1016/j.copbio.2011.09.006
- Clark, I. D., & Fritz, P. (2013). *Environmental isotopes in hydrogeology*: CRC press.
- Claro, C., Ogalla, E., Rodriguez-Rodriguez, R., Herrera, M. D., & Alvarez de Sotomayor, M. (2015). Phenolic content of extra virgin olive oil is essential to restore endothelial dysfunction but not to prevent vascular inflammation in atherosclerotic lesions of Apo E deficient mice. *Journal of Functional Foods*, 15, 126-136. doi:10.1016/j.jff.2015.03.008
- Coccia, A., Bastianelli, D., Mosca, L., Monticolo, R., Panuccio, I., Carbone, A., . . . Lendaro, E. (2014). Extra virgin olive oil phenols suppress migration and invasion of T24

- human bladder cancer cells through modulation of matrix metalloproteinase-2. *Nutr Cancer*, 66(6), 946-954. doi:10.1080/01635581.2014.922204
- COI. (2018). Conselho Oleícola Internacional. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/76-the-olive-tree> (consultado em 29/07/2019).
- Comissão Europeia. (2007) Regulamento (CE) n. 1234/2007 do conselho de 22 de outubro de 2007, que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «OCM única»), Jornal Oficial da União Europeia.
- Comissão Europeia. (2006). Regulamento (CE) Nº 510/2006 do Conselho de 20 de Março relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios de 2006, Jornal Oficial da União Europeia.
- Commission, C. A. (2003). Standard for olive oils and olive pomace oils. *Codex Stan*, 33(8).
- Covas, M.-I., Khymenets, O., Fitó, M., & de la Torre, R. (2009). Bioavailability and antioxidant effect of olive oil phenolic compounds in humans. In Dimitriou Boskou (Eds.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health* (pp. 109-128).
- Craig, H., & Gordon, L. I. (1965). Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere, *Marine Geochemistry* (3), 277.
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*, 10, 22-31. doi:10.1016/j.cofs.2016.07.003
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132. doi:10.1016/j.trac.2016.02.026
- Dansgaard, W. (1964). Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16(4), 436-468. doi:10.3402/tellusa.v16i4.8993

- De Laeter, J., & Kurz, M. D. (2006). Alfred Nier and the sector field mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 41(7), 847-854. doi:10.1002/jms.1057
- Di Giovacchino, L. (2000). Technological Aspects. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 17-59). Boston, MA: Springer US.
- Dilis, V., & Trichopolou, A. (2009). Mediterranean diet and olive oil consumption- Estimations of daily intake of antioxidants from Virgin Olive Oil and olives. In *Olive Oil. Minor Constituents and Health* (pp. 201-210).
- Drivelos, S. A., & Georgiou, C. A. (2012). Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 40, 38-51. doi:10.1016/j.trac.2012.08.003
- DSPA. (2018). Data Science Portuguese Association. Conceitos Data Science. <http://www.dsapa.pt/glossario.html> (consultado em 31/05/2019).
- Ellam, R. (2016). *Isotopes: a very short introduction* (Vol. 476): Oxford University Press.
- Erkkila, B., Chakraborty, S., Tipple, B. J., Cerling, T. E., Ehleringer, J. R., & Cook, C. S. (2017). *Stable Isotope Biogeochemistry and Ecology: Laboratory Manual*: Independently Published.
- Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., . . . Steffen, W. (2000). The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science*, 290(5490), 291-296. doi:10.1126/science.290.5490.291
- Farquhar, G. D., O'Leary, M. H., & Berry, J. A. (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Functional Plant Biology*, 9(2), 121-137.
- Ferreira, A. (2008). *Epectrometria de massa de razões isotópicas* (Doutoramento em Química), Universidade de Lisboa.
- Fry, B. (2006). *Stable isotope ecology* (Vol. 521): Springer.

- Gannes, L. Z., del Rio, C. M. n., & Koch, P. (1998). Natural Abundance Variations in Stable Isotopes and their Potential Uses in Animal Physiological Ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(3), 725-737. doi:[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)01016-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)01016-2)
- Garcia-Gavilan, J. F., Bullo, M., Canudas, S., Martinez-Gonzalez, M. A., Estruch, R., Giardina, S., . . . Salas-Salvado, J. (2018). Extra virgin olive oil consumption reduces the risk of osteoporotic fractures in the PREDIMED trial. *Clin Nutr*, 37(1), 329-335. doi:10.1016/j.clnu.2016.12.030
- Gemperline, P. (2006). *Practical guide to chemometrics*: CRC press.
- Ghosh, P., & Brand, W. A. (2003). Stable isotope ratio mass spectrometry in global climate change research. *International Journal of Mass Spectrometry*, 228(1), 1-33. doi:10.1016/s1387-3806(03)00289-6
- Gomes, V. (2013). *Análise estatística multivariada aplicada a dados hidrogeológicos*. (Mestrado em Estatística), Universidade de Lisboa.
- Gómez-Caravaca, A. M., Maggio, R. M., & Cerretani, L. (2016). Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Analytica Chimica Acta*, 913, 1-21. doi:10.1016/j.aca.2016.01.025
- González, A. G. (2015). Critical Aspects of Supervised Pattern Recognition Methods for Interpreting Compositional Data. In J. Redlin (Ed.), *Applied Principles of Chemometrics*: NY Research Press.
- Gonzalez-Santiago, M., Fonolla, J., & Lopez-Huertas, E. (2010). Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacol Res*, 61(4), 364-370. doi:10.1016/j.phrs.2009.12.016
- Gonzalvez, A., Armenta, S., & de la Guardia, M. (2009). Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1295-1311. doi:10.1016/j.trac.2009.08.001

- GPP. (2017). Gabinete de Planeamento Políticas e Administração Geral. Ficha de internacionalização - Azeite. <http://213.30.17.29/GlobalAgriMar/informacao/docs/produtos/Fichas/AzeiteFI.pdf> (consultado em 15/06/2019).
- GPP. (2018). Gabinete de Planeamento Políticas e Administração Geral. Sistema de Informação do Azeite e Azeitona de Mesa. <http://www.gpp.pt/index.php/estatisticas-e-analises/siaz-sistema-de-informacao-sobre-o-azeite-e-a-zeitona-de-mesa-2> (consultado em 15/06/2019).
- Granato, D., & Ares, G. (2014). *Mathematical and statistical methods in food science and technology*: John Wiley & Sons.
- Guasch-Ferre, M., Salas-Salvado, J., Ros, E., Estruch, R., Corella, D., Fito, M., . . . Investigators, P. (2017). The PREDIMED trial, Mediterranean diet and health outcomes: How strong is the evidence? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 27(7), 624-632. doi:10.1016/j.numecd.2017.05.004
- Guillén, N., Acín, S., Navarro, M. A., Carlos Surra, J., Arnal, C., Manuel Lou-Bonafonte, J., . . . Osada, J. (2009). Knowledge of the Biological Actions of Extra Virgin Olive Oil Gained From Mice Lacking Apolipoprotein E. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 62(3), 294-304. doi:https://doi.org/10.1016/S1885-5857(09)71560-9
- Gumus, Z. P., Celenk, V. U., Tekin, S., Yurdakul, O., & Ertas, H. (2017). Determination of trace elements and stable carbon isotope ratios in virgin olive oils from Western Turkey to authenticate geographical origin with a chemometric approach. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1719-1727. doi:10.1007/s00217-017-2876-4
- Hayes, J. M. (2001). Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. *Stable isotope geochemistry*, 43 (pp 225-277).
- Hayes, J. M. (2002). In Alex L. Sessions (Eds). *Practice and Principles of Isotopic Measurements in Organic Geochemistry (Revision 2)*.
- Hoefs, J. (2009). *Stable isotope geochemistry* (6th ed. Vol. 201): Springer.

- Huang, C. L., & Sumpio, B. E. (2008). Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. *J Am Coll Surg*, 207(3), 407-416. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2008.02.018
- Iacumin, P., Bernini, L., & Boschetti, T. (2009). Climatic factors influencing the isotope composition of Italian olive oils and geographic characterisation. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23(3), 448-454. doi:10.1002/rcm.3896
- Jasper, J. P., Zhang, F., Poe, R. B., & Linhardt, R. J. (2015). Stable isotopic analysis of porcine, bovine, and ovine heparins. *J Pharm Sci*, 104(2), 457-463. doi:10.1002/jps.24134
- Jiménez-Morillo, N. T., Cabrita, M. J., Dias, C. B., González-Vila, F. J., & González-Pérez, J. A. (2020). Pyrolysis-compound-specific hydrogen isotope analysis ($\delta^2\text{H}$ Py-CSIA) of Mediterranean olive oils. *Food Control*, 110, 107023. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107023
- Jones, M. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9504547> (consultado em 02/05/2019).
- Kampa, M., Pelekanou, V., Notas, G., & Castanas, E. (2009). Olive oil phenols, basic cell mechanisms and cancer. In *Olive Oil: Minor Constituents and Health* (pp. 129-172).
- Kelly, S., Heaton, K., & Hoogewerff, J. (2005). Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 555-567. doi:10.1016/j.tifs.2005.08.008
- Kelly, S. D., & Rhodes, C. (2002). Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 53, 34-44.
- Kritioti, A., Menexes, G., & Drouza, C. (2018). Chemometric characterization of virgin olive oils of the two major Cypriot cultivars based on their fatty acid composition. *Food Res Int*, 103, 426-437. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.064
- Le Bot, B., Oulhote, Y., Deguen, S., & Glorennec, P. (2011). Using and interpreting isotope data for source identification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 302-312. doi:10.1016/j.trac.2010.10.015

- León-Camacho, M., Morales, M. T., & Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Traceability Issues. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 163-217). Boston, MA: Springer US.
- Lopez-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimon, L., Covas, M. I., . . . Yiannakouris, N. (2010). Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20(4), 284-294. doi:10.1016/j.numecd.2009.12.007
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 201-211. doi:10.1016/j.tifs.2009.12.004
- Luykx, D. M. A. M., & van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911. doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.038
- Mader, M., Schmidt, C., van Geldern, R., & Barth, J. A. C. (2017). Dissolved oxygen in water and its stable isotope effects: A review. *Chemical Geology*, 473, 10-21. doi:10.1016/j.chemgeo.2017.10.003
- Marshall, J. D., Brooks, J. R., & Lajtha, K. (2007). Sources of Variation in the Stable Isotopic Composition of Plants. In M. a. K. Lajtha (Ed.), *Stable isotopes in ecology and environmental science* (pp. 22-60).
- McGuire, K., & McDonnell, J. (2007). Stable isotope tracers in watershed hydrology. *Stable isotopes in ecology and environmental science*, 334.
- Melzer, E., & Schmidt, H. L. (1987). Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *J Biol Chem*, 262(17), 8159-8164.

- Menotti, A., & Puddu, P. E. (2015). How the Seven Countries Study contributed to the definition and development of the Mediterranean diet concept: a 50-year journey. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 25(3), 245-252. doi:10.1016/j.numecd.2014.12.001
- Messai, H., Farman, M., Sarraj-Laabidi, A., Hammami-Semmar, A., & Semmar, N. (2016). Chemometrics Methods for Specificity, Authenticity and Traceability Analysis of Olive Oils: Principles, Classifications and Applications. *Foods*, 5(4). doi:10.3390/foods5040077
- Michener, R., & Lajtha, K. (2008). *Stable isotopes in ecology and environmental science*: John Wiley & Sons.
- Mihailova, A., Abbado, D., Kelly, S. D., & Pedentchouk, N. (2015). The impact of environmental factors on molecular and stable isotope compositions of n-alkanes in Mediterranean extra virgin olive oils. *Food Chem*, 173, 114-121. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.003
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 4th. Essex, UK: Pearson Education Limited.
- Montserrat-de la Paz, S., Naranjo, M. C., Lopez, S., Abia, R., Muriana, F. J. G., & Bermudez, B. (2016). Olive oil, compared to a saturated dietary fat, has a protective role on atherosclerosis in niacin-treated mice with metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 26, 557-564. doi:10.1016/j.jff.2016.08.028
- Muhammad, S. A., Seow, E. K., Mohd Omar, A. K., Rodhi, A. M., Mat Hassan, H., Lalung, J., . . . Ibrahim, B. (2018). Variation of delta(2)H, delta(18)O & delta(13)C in crude palm oil from different regions in Malaysia: Potential of stable isotope signatures as a key traceability parameter. *Sci Justice*, 58(1), 59-66. doi:10.1016/j.scijus.2017.05.008
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th Ed): Macmillan.

- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20(4), 553-567. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85134-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5)
- O'Leary, M. H. (1988). Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*, 38(5), 328-336.
- O'Leary, M. H. (1993). 3 - Biochemical Basis of Carbon Isotope Fractionation. In J. R. Ehleringer, A. E. Hall, & G. D. Farquhar (Eds.), *Stable Isotopes and Plant Carbon-water Relations* (pp. 19-28). San Diego: Academic Press.
- Otto, M. (2016). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*: John Wiley & Sons.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, 1(2), 107-112. doi:10.1016/s1470-2045(00)00015-2
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 647-659. doi:[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00061-2)
- Paiva-Martins, F., & Kiritsakis, A. (2017). Olive fruit and olive oil composition and their functional compounds. In *Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity, Chemistry and Processing* (Vol. 15, pp. 35).
- Paolini, M. (2017). *Development and implementation of stable isotope ratio analysis in bulk products and sub-components to ensure food traceability*. (Ph.D. in Food Science), University of Udine.
- Perona, J. S., & Botham, K. M. (2013). Olive oil as a functional food: nutritional and health benefits. In *Handbook of Olive Oil* (pp. 677-714): Springer.
- Perri, E., Benincasa, C., & Muzzalupo, I. (2012). Olive Oil Traceability. In *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy* (pp 265-286).

- Porcelli, D., & Baskaran, M. (2012). An overview of isotope geochemistry in environmental studies. In *Handbook of environmental isotope geochemistry* (pp. 11-32): Springer.
- Portarena, S., Baldacchini, C., & Brugnoli, E. (2017). Geographical discrimination of extra-virgin olive oils from the Italian coasts by combining stable isotope data and carotenoid content within a multivariate analysis. *Food Chem*, *215*, 1-6. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.135
- Portarena, S., Farinelli, D., Lauteri, M., Famiani, F., Esti, M., & Brugnoli, E. (2015). Stable isotope and fatty acid compositions of monovarietal olive oils: Implications of ripening stage and climate effects as determinants in traceability studies. *Food Control*, *57*, 129-135. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.052
- Portarena, S., Gavrichkova, O., Lauteri, M., & Brugnoli, E. (2014). Authentication and traceability of Italian extra-virgin olive oils by means of stable isotopes techniques. *Food Chem*, *164*, 12-16. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.115
- Redlin, J. (2015). *Applied Principles of Chemometrics*: NY Research Press.
- Reid, L. M., O'Donnell, C. P., & Downey, G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(7), 344-353. doi:10.1016/j.tifs.2006.01.006
- Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M., & Morozzi, G. (2013). Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *J Nutr Biochem*, *24*(8), 1513-1519. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.12.011
- Rossmann, A. (2001). Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*, *17*(3), 347-381.
- Royer, A., Gerard, C., Nault, N., Lees, M., & Martin, G. (1999). Stable isotope characterization of olive oils. I—Compositional and carbon-13 profiles of fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*(3), 357-363.

- Sabatelli, A. D., Pearson, A., & Jasper, J. P. (2017). Process Patent Protection via Analysis of Stable Isotope Ratios. *Organic Process Research & Development*, 21(7), 956-965. doi:10.1021/acs.oprd.7b00069
- Salas, J. J., Harwood, J. L., & Martínez-Force, E. (2013). Lipid metabolism in olive: biosynthesis of triacylglycerols and aroma components. In *Handbook of Olive Oil* (pp. 97-127): Springer.
- Santos, C. S. P., Cruz, R., Cunha, S. C., & Casal, S. (2013). Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*, 54(2), 2016-2024. doi:10.1016/j.foodres.2013.04.014
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A., & Eisenreich, W. (2003). Systematics of ^2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. *Phytochemistry Reviews*, 2(1-2), 61-85.
- Schmidt, H.-L., Werner, R. A., & Roßmann, A. (2001). Review: ^{18}O Pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry*, 58(1), 9-9-32. doi:10.1016/S0031-9422(01)00017-6
- Schneider, L. V., & Hall, M. P. (2005). Stable isotope methods for high-precision proteomics. *Drug Discovery Today*, 10(5), 353-363. doi:10.1016/s1359-6446(05)03381-7
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113-127. doi:10.1016/s0021-9673(04)01423-2
- Sessions, A. L., Burgoyne, T. W., Schimmelmann, A., & Hayes, J. M. (1999). Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Organic Geochemistry*, 30(9), 1193-1200. doi:https://doi.org/10.1016/S0146-6380(99)00094-7
- Sharp, Z. (2017). *Principles of stable isotope geochemistry* (2nd Ed).

- Sodemann, H. (2006). *Tropospheric transport of water vapour - Lagrangian and Eulerian perspectives*. ETH.
- Spangenberg, J. E. (2016). Bulk C, H, O, and fatty acid C stable isotope analyses for purity assessment of vegetable oils from the southern and northern hemispheres. *Rapid Commun Mass Spectrom*. doi:10.1002/rcm.7734
- Stichler, W., Gonfiantini, R., & Rozanski, K. (1995). Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements. *IAEA TECDOC, 825(67-74)*, 5.
- Storniolo, C. E., Rosello-Catafau, J., Pinto, X., Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2014). Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1. *Redox Biol, 2*, 971-977. doi:10.1016/j.redox.2014.07.001
- Sulzman, E. W. (2007). Stable isotope chemistry and measurement: a primer. In *Stable isotopes in ecology and environmental science* (Vol. 2, pp. 1-21).
- Tsimidou, M. Z. (2013). Analytical methodologies: Phenolic compounds related to olive oil taste issues. In *Handbook of Olive oil* (pp. 311-333): Springer.
- van der Veer, G., Voerkelius, S., Lorentz, G., Heiss, G., & Hoogewerff, J. A. (2009). Spatial interpolation of the deuterium and oxygen-18 composition of global precipitation using temperature as ancillary variable. *Journal of Geochemical Exploration, 101(2)*, 175-184. doi:https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2008.06.008
- Visioli, F., Franco, M., Toledo, E., Luchsinger, J., Willett, W. C., Hu, F. B., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2018). Olive oil and prevention of chronic diseases: Summary of an International conference. *Nutr Metab Cardiovasc Dis, 28(7)*, 649-656. doi:10.1016/j.numecd.2018.04.004
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*.

- von Caemmerer, S., & Quick, W. P. (2000). Rubisco: Physiology in Vivo. In R. C. Leegood, T. D. Sharkey, & S. von Caemmerer (Eds.), *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (pp. 85-113). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Voncina, D. B. (2009). Chemometrics in analytical chemistry. *Nova Biotechnologica*, 9 (2), 211-216.
- Vossen, P. (2013). Growing Olives for Oil. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 19-56). Boston, MA: Springer US.
- Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., . . . Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 77-90. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.001
- Wokovich, A. M., Spencer, J. A., Westenberger, B. J., Buhse, L. F., & Jasper, J. P. (2005). Stable isotopic composition of the active pharmaceutical ingredient (API) naproxen. *J Pharm Biomed Anal*, 38(4), 781-784. doi:10.1016/j.jpba.2005.02.033
- Yakir, D., & DeNiro, M. J. (1990). Oxygen and hydrogen isotope fractionation during cellulose metabolism in *Lemna gibba* L. *Plant Physiology*, 93(1), 325-332.
- Zachleder, V., Vitova, M., Hlavova, M., Moudrikova, S., Mojzes, P., Heumann, H., . . . Bisova, K. (2018). Stable isotope compounds - production, detection, and application. *Biotechnol Adv*, 36(3), 784-797. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.010
- Zhao, Y., Zhang, B., Chen, G., Chen, A., Yang, S., & Ye, Z. (2014). Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. *Food Chem*, 145, 300-305. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.062

Sites consultados:

<http://bio1510.biology.gatech.edu> (consultado a 07/10/2019)

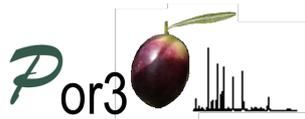
<http://portaldoclima.pt/pt/> (consultado a 16/11/2019)

[http://www.ebd.csic.es/IsotopeCourse/Conferences/2014%20Fundamentals%20of%20IRMS%20-%20EBD%20course%20-%20Sevilla%20\[Lecture%20seule\].pdf](http://www.ebd.csic.es/IsotopeCourse/Conferences/2014%20Fundamentals%20of%20IRMS%20-%20EBD%20course%20-%20Sevilla%20[Lecture%20seule].pdf)
(consultado a 15/11/2019).

<http://www.sahara.arizona.edu/programs/isotopes/oxygen.html> (consultado a 04/11/2019).

<https://www.jobilize.com/online/course/photosynthetic-pathways-photosynthesis-global-climate-by-openstax?page=1> (consultado a 07/10/2019)

https://www.sciencelearn.org.nz/image_maps/3-carbon-cycle (consultado a 06/10/2019)



Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto Por30 – Portuguese Olive Oil Omics or traceability and authenticity.