

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia

Departamento de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Análise comparativa de azeites virgem extra de vários DOP:
caracterização reológica, físico-química e cromatográfica**

Cláudia Joana Saraiva Marques

Dissertação

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2015

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia

Departamento de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Análise comparativa de azeites virgem extra de vários DOP:
caracterização reológica, físico-química e cromatográfica**

Cláudia Joana Saraiva Marques

Dissertação orientada pela
Prof.^ª Doutora Lídia Maria Veloso Pinheiro e pela Prof.^ª Doutora Ana Francisca Simão Bettencourt

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os intervenientes que me ajudaram direta ou indiretamente à execução deste trabalho, com especial atenção:

Aos meus pais e irmão pelo incentivo, paciência e apoio incondicional;

Aos meus avós que muito me ajudaram durante o meu percurso académico;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lídia Pinheiro, e coorientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Bettencourt, pela sugestão do tema e bibliografia cedida, bem como pela disponibilidade, orientação, conhecimentos transmitidos, esclarecimentos e apoio na realização deste trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Rosário Bronze pelo tempo despendido bem como auxílio na execução e análise dos métodos experimentais referentes aos compostos fenólicos;

Às Prof.^a Dr.^a Noémia Duarte e Prof.^a Dr.^a Paula Leandro pelo auxílio prestado na realização dos diversos métodos laboratoriais;

Às minhas colegas de laboratório pela amizade, apoio, sugestões e companhia indispensáveis;

À FCT (PEst-OE/SAU/UI4013/2011) pelo financiamento concedido.

RESUMO

Na dieta mediterrânea, o azeite constitui uma das gorduras mais utilizadas nas diversas técnicas culinárias bem como no tempero de alimentos crus. Um exemplo relevante é o da fritura de alimentos, onde a riqueza do azeite virgem extra em ácidos gordos monoinsaturados e a presença de antioxidantes naturais, associados à sua elevada estabilidade à oxidação, adequam a sua utilização.

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito da temperatura no azeite virgem extra, nomeadamente durante alguns processos térmicos tradicionalmente associados às técnicas de culinária. A qualidade dos azeites estudados foi avaliada através de parâmetros reológicos (energia de ativação de fluxo e viscosidade), cromatográficos (teor de compostos fenólicos) e físico-químicos (densidade relativa, coeficientes de extinção específica no UV, teor de compostos fenólicos totais, bem como índices de acidez, Bellier, iodo, peróxidos, refração e saponificação).

Nesse sentido foram selecionados e comparados quatro azeites virgem extra de Denominação de Origem Protegida (DOP) de Trás-os-Montes, do Norte Alentejano, do Ribatejo e de Moura, bem como outro de produção biológica da região da Guarda.

Na execução deste trabalho as amostras dos azeites selecionados foram analisadas antes e após aquecimento, a fim de inferir acerca das modificações provocadas pelo aumento da temperatura nos parâmetros mencionados. Estes processamentos térmicos foram realizados a três temperaturas diferentes (60°C, 100°C e 180°C) num período de 30 minutos. Para os processamentos a 180°C as amostras foram sujeitas a três ciclos, simulando assim a reutilização do meio de fritura. No entanto, as condições estudadas não mimetizam verdadeiramente as observadas no processo de fritura numa cozinha doméstica ou industrial, uma vez que se pretendeu avaliar apenas o fator temperatura.

Os resultados obtidos sugerem que o aquecimento modifica a composição do azeite virgem extra. No entanto, na presença de técnicas culinárias mais simples a mesma não é alterada significativamente. Em contraste, os processamentos a temperaturas elevadas, como ocorrido nos processos de fritura, modificam a estabilidade do produto alimentar em estudo.

Palavras-Chave: Azeite Virgem Extra, Parâmetros de Qualidade, Processamentos Térmicos, Reologia, Compostos Fenólicos.

ABSTRACT

Olive oil is one of the most commonly used fats in the Mediterranean diet for raw food seasoning as well as different cooking techniques such as frying. In particular, extra virgin olive oil has high levels of monounsaturated fatty acids and natural antioxidants, responsible for its high oxidative stability, which make the olive oil suited for different culinary uses.

The aim of this work is to study the effect of temperature on extra virgin olive oil during some thermal processes related to cooking techniques. We will assess the quality of extra virgin olive oils before and after simulated cooking conditions by determining the rheological properties (flow activation energy and viscosity) and the physicochemical properties (relative density, specific extinction in UV, concentration of total phenols, free acidity, Bellier index, iodine value, peroxide value, refractive index and saponification value). Additionally we will evaluate the different phenolic profiles given by HPLC.

To do so, four extra virgin olive oils of Protected Designation of Origin (Trás-os-Montes, Norte Alentejano, Ribatejo and Moura) as well as one olive oil provided by a producer of the Guard region were selected and compared.

In this work, the selected extra virgin olive oils were heated at three different temperatures (60, 100 e 180°C) for 30 minutes in order to evaluate the changes caused by increasing temperature on the quality of the olive oils. Additionally, for the processing at 180°C, the samples were reheated three times to simulate the reuse of the frying medium. However, these heating conditions don't truly correspond to those observed in a domestic or industrial kitchen because the only factor present was the temperature.

In conclusion, the olive oil samples showed degradation signs caused by heating. In fact, the simplest cooking techniques don't change significantly the extra virgin olive oil's quality, whereas more aggressive techniques (high temperatures), such as frying, caused thermal degradation responsible for modifications on the extra virgin olive oil composition.

Key-words: Extra Virgin Olive Oil, Quality Parameters, Heating, Rheology, Phenolic Content.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Lista de Constantes Físicas e Químicas	xi
Lista de Símbolos	xii
Cap. 1 – Introdução	1
Cap. 2 – Revisão Bibliográfica	2
2.1 Azeite	2
2.1.1. Azeites DOP	2
2.1.1.1. Denominação de Origem Protegida de Moura	2
2.1.1.2. Denominação de Origem Protegida do Norte Alentejano	3
2.1.1.3. Denominação de Origem Protegida do Ribatejo.....	3
2.1.1.4. Denominação de Origem Protegida de Trás-os-Montes.....	3
2.1.2. Azeites de Agricultura Biológica e de Quinta	4
2.1.3. Classificação do Azeite	4
2.1.3.1. Azeite Virgem.....	5
2.1.3.2. Azeite Refinado.....	6
2.1.3.3. Azeite – composto por azeite refinado e azeite virgem	6
2.1.3.4. Óleo de bagaço de azeitona bruto	6
2.1.3.5. Óleo de bagaço de azeitona refinado	6
2.1.3.6. Óleo de bagaço de azeitona	7
2.1.4. Composição	7
2.1.4.1. Triacilgliceróis e ácidos Gordos	8
2.1.4.2. Compostos minoritários	8
2.1.5. Processo de Extração	10
2.1.5.1. Colheita	10
2.1.5.2. Transporte e Armazenagem	11
2.1.5.3. Limpeza e Lavagem.....	11
2.1.5.4. Moenda	11
2.1.5.5. Termobatedura	12
2.1.5.6. Decantação e centrifugação.....	12
2.1.5.7. Filtração.....	14
2.1.5.8. Armazenagem.....	14
2.1.5.9. Acondicionamento	14
2.1.5.10. Refinação	17
2.1.6. Variedades de Azeitonas	21
2.1.6.1. Cobrançosa	21
2.1.6.2. Cordovil	21
2.1.6.3. Galega	21
2.1.6.4. Madural.....	22
2.1.6.5. Verdeal.....	22
2.1.6.6. Picual	22

2.2.	<i>Benefícios para a Saúde</i>	22
2.3.	<i>Fatores que Afectam a Qualidade do Azeite</i>	23
2.3.1.	Fatores Agronómicos	23
2.3.2.	Fatores Tecnológicos	23
2.3.3.	Processamento Térmico.....	24
2.3.3.1.	Impacto na Saúde	26
2.3.3.2.	Regulamento para Descarte de Óleos de Fritura	26
2.4.	<i>Reologia</i>	27
2.4.1.	Viscosidade	28
2.4.2.	Comportamento Reológico	29
2.4.2.1.	Fluidos Newtonianos	29
2.4.2.2.	Fluidos Não-newtonianos.....	29
2.4.3.	Efeito da Temperatura sobre a Viscosidade	31
2.4.4.	Aplicação na Indústria	32
2.5.	<i>Parâmetros Analíticos</i>	33
2.5.1.	Densidade Relativa	33
2.5.2.	Índice de Acidez	33
2.5.3.	Índice de Bellier	34
2.5.4.	Índice de Iodo.....	34
2.5.5.	Índice de Peróxidos	34
2.5.6.	Índice de Refração.....	34
2.5.7.	Índice de Saponificação.....	35
2.5.8.	Coeficientes de Extinção	35
2.5.9.	Teor de Compostos Fenólicos	36
Cap. 3 –	<i>Procedimento Experimental</i>	37
3.1.	<i>Amostras</i>	37
3.1.1.	Preparação das Amostras.....	38
3.1.1.1.	Ensaio reológico para determinação da energia de ativação	38
3.1.1.2.	Outros ensaios	38
3.1.1.3.	Equipamento para o processamento térmico das amostras	39
3.2.	<i>Materiais e Metodologias</i>	39
3.2.1.	Análise Reológica	39
3.2.1.1.	Efeito da Temperatura Sobre a Viscosidade - Energia de Ativação	39
3.2.1.2.	Avaliação Reológica	41
3.2.2.	Análise Físico-Química	42
3.2.2.1.	Densidade Relativa	42
3.2.2.2.	Índice de Refração	44
3.2.2.3.	Índice de Acidez	46
3.2.2.4.	Índice de Bellier	48
3.2.2.5.	Índice de Iodo	49
3.2.2.6.	Índice de Peróxidos.....	51
3.2.2.7.	Índice de Saponificação	53
3.2.2.8.	Coeficientes de Extinção.....	55
3.2.3.	Análise do Teor de Fenóis	57

3.2.3.1.	Método de Folin-Ciocalteu	57
3.2.3.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	61
Cap. 4 – Análise Estatística		61
Cap. 5 – Resultados e Discussão		62
5.1. Análise Reológica.....		62
5.1.1.	Efeito da Temperatura Sobre a Viscosidade - Energia de Ativação	62
5.1.2.	Avaliação Reológica	67
	<i>Azeite A</i>	68
	<i>Azeite B</i>	71
	<i>Azeite T</i>	73
	<i>Azeite R</i>	75
	<i>Azeite M</i>	78
	<i>Efeito do Tempo</i>	81
	<i>Efeito do Processamento Térmico</i>	82
5.2. Análise Físico-Química		84
5.2.1.	Densidade Relativa	84
5.2.2.	Índice de Refração.....	86
5.2.3.	Índice de Acidez	88
5.2.4.	Índice de Bellier.....	90
5.2.5.	Índice de Iodo.....	91
5.2.6.	Índice de Peróxidos	92
5.2.7.	Índice de Saponificação.....	94
5.2.8.	Coeficientes de Extinção	95
	<i>Azeite A</i>	96
	<i>Azeite B</i>	97
	<i>Azeite T</i>	98
	<i>Azeite R</i>	99
	<i>Azeite M</i>	100
	<i>Efeito do Processamento Térmico</i>	102
5.3. Análise do Teor de Fenóis		104
5.3.1.	Método de Folin-Ciocalteu	104
	<i>Efeito do Processamento Térmico</i>	105
5.3.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	107
	<i>Análise PCA</i>	110
5.4. Análise Conjunta.....		121
5.4.1.	PCA.....	121
5.4.2.	Correlações Entre os Parâmetros Estudados.....	127
Cap. 6 – Conclusões Finais		130
Cap. 7 – Trabalhos Futuros		132
Referências		133
	<i>Legislação</i>	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões DOP.....	4
Figura 2 - Composição da pasta de azeitona.....	13
Figura 3 - Sistema de produção utilizando um decantador de três fases	15
Figura 4 - Sistema de produção utilizando um decantador de duas fases	16
Figura 5 - Processo de extração do óleo de bagaço de azeitona bruto	18
Figura 6 - Processo de refinação	20
Figura 7 – escoamento lamelar de um fluido	28
Figura 8 - Curvas de fluxo de fluidos independentes do tempo.....	30
Figura 9 - Variedades de azeitonas das amostras de azeites virgem extra em estudo	37
Figura 10 - Tratamento das amostras.....	38
Figura 11 - Montagem para o ensaio da energia de ativação de fluxo.....	40
Figura 12 - Montagem para a determinação da viscosidade	41
Figura 13 - Refratômetro de Abbe	45
Figura 14 - Campo visual do refratômetro de Abbe.....	45
Figura 15 - Escala de um refratômetro de Abbe.....	45
Figura 16 - Titulação efetuada na determinação do índice de acidez	47
Figura 17 - Aparecimento de turvação no índice de Bellier	49
Figura 18 - Titulação efetuada para a determinação do índice de iodo	50
Figura 19 - Coloração obtida no índice de peróxidos.....	53
Figura 20 - Coloração obtida para processamento térmico a 180°C (índice de saponificação)	54
Figura 21 - Coloração obtida para a ausência de processamento térmico (índice de saponificação).....	54
Figura 22 - Coloração obtida referente ao método de Folin-Ciocalteu	60
Figura 23 - Curvas de fluxo tensão de corte em função da velocidade de corte para todas as temperaturas de trabalho (azeite A).....	63
Figura 24 - Relação entre a viscosidade dinâmica e a temperatura	65
Figura 25 - Variação do logaritmo da viscosidade dinâmica em função do inverso da temperatura	66
Figura 26 – Curva de fluxo da tensão de corte vs velocidade de corte para o azeite A ($t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	68
Figura 27 – Curva de fluxo da tensão de corte vs velocidade de corte para o azeite A ($t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)	69
Figura 28 - Representação gráfica da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite A)	70
Figura 29 – Curva de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte do azeite B ($t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)	71
Figura 30 - Curvas de fluxo relativas à viscosidade ou viscosidade aparente do azeite B para todas as condições de processamento.....	72
Figura 31 - Curva de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte para o azeite T ($t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$)	73

Figura 32 - Valores de viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite T)	74
Figura 33 - Relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte referente ao azeite R ($t = 180^{\circ}\text{C}$, ciclo 1)	75
Figura 34 - Curvas de fluxo da viscosidade ou viscosidade aparente e velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite R).....	77
Figura 35 - Relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte referente ao azeite M ($t = 180^{\circ}\text{C}$, ciclo 1, 2 e 3).....	79
Figura 36 - Reograma da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite M)	80
Figura 37 - Avaliação da dependência do tempo para o Azeite T ($t = 180^{\circ}\text{C}$, ciclo 3)	81
Figura 38 - Variação da viscosidade dinâmica das amostras de azeite em função das condições de processamento térmico.....	82
Figura 39 - Variação da densidade relativa com o processamento térmico para os azeites estudados	85
Figura 40 - Variação do índice de refração com o processamento térmico correspondente a todos os azeites estudados.....	87
Figura 41 - Variação do índice de acidez com o processamento térmico para todos os azeites estudados..	88
Figura 42 - Variação do índice de Bellier com o processamento térmico para todos os azeites estudados..	90
Figura 43 - Variação do índice de iodo com o processamento térmico para todos os azeites estudados.....	91
Figura 44 – Representação gráfica da variação do índice de peróxidos com o processamento térmico para todos os azeites estudados	92
Figura 45 - Variação do índice de saponificação com o processamento térmico para todos os azeites estudados.....	95
Figura 46 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite A	96
Figura 47 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite B	97
Figura 48 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite T	99
Figura 49 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite R	100
Figura 50 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite M.....	101
Figura 51 - Variação de K_{232} com o processamento térmico para todos os azeites em estudo	102
Figura 52 - Variação de K_{270} com o processamento térmico para todos os azeites em estudo	103
Figura 53 - Representação gráfica do teor de compostos fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu)....	105
Figura 54 - Gráfico do teor de fenóis totais em função do coeficiente de extração a 270 nm	106
Figura 55 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras M (20°C), M (60°C), M (100°C), M (180°C – primeiro ciclo), M (180°C – segundo ciclo), M (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H_2O) a 280 nm.....	108
Figura 56 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras M (20°C), M (60°C), M (100°C), M (180°C – primeiro ciclo), M (180°C – segundo ciclo), M (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H_2O) a 280 nm.....	109
Figura 57 - Projeção das amostras no espaço definido pelas 2 primeiras componentes (variância total acumulada 54,2%).....	113
Figura 58 - Distribuição das variáveis (PC 1 e 2)	114

Figura 59 - Representação gráfica da análise de <i>clusters</i>	115
Figura 60 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H ₂ O) a 280 nm	117
Figura 61 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H ₂ O) a 280 nm	118
Figura 62 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H ₂ O) a 280 nm	119
Figura 63 - Gráfico de correlação entre os fenóis totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e a área total dos compostos detetados pelo HPLC.....	121
Figura 64 - Representação gráfica da análise de <i>clusters</i>	124
Figura 65 - Projeção das amostras no espaço definido pelas 2 primeiras componentes (variância total acumulada 72,3%).....	125
Figura 66 - Distribuição das variáveis (PC 1 e 2)	126

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns parâmetros específicos das categorias de azeite	7
Tabela 2 - Valores tabelados para a densidade da água	43
Tabela 3 - Tomas das amostras para o índice de peróxidos	52
Tabela 4 - Preparação das soluções de ácido cafeico	59
Tabela 5 - Equações resultantes do ajuste ao modelo newtoniano e respectivas viscosidades dinâmicas para diferentes temperaturas.....	63
Tabela 6 - Valores de viscosidade referidos na literatura	64
Tabela 7 - Parâmetros da equação de Arrhenius	66
Tabela 8 - Valores de energia de ativação de fluxo descritos na literatura	67
Tabela 9 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite A)	69
Tabela 10 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite B)	72
Tabela 11 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite T).....	74
Tabela 12 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite R)	76
Tabela 13 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite M)	78
Tabela 14 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite A	97
Tabela 15 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite B	98
Tabela 16 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite T	99
Tabela 17 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite R	100
Tabela 18 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite M.....	101
Tabela 19 - Equações referentes às retas de calibração	104
Tabela 20 - Variância total e variância total acumulada nas 3 primeiras componentes principais	110
Tabela 21 - Contribuição das variáveis para as 3 primeiras componentes	111
Tabela 22 - Variância total e variância total acumulada nas 2 primeiras componentes principais	122
Tabela 23 - Contribuição das variáveis para as 2 primeiras componentes	122
Tabela 24 - Correlação entre os diversos parâmetros avaliados	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
DOP	Denominação de Origem Protegida
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IA	Índice de Acidez
ICI	Monocloreto de Iodo
IP	Índice de Peróxidos
KCl	Cloreto de Potássio
KI	Iodeto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de Sódio
NaI	Iodeto de Sódio
PCA	Análise por Componentes Principais
ROOH	Grupo Hidroperóxido
UV	Radiação Ultravioleta

LISTA DE CONSTANTES FÍSICAS E QUÍMICAS

R (constante universal dos gases)	8,314 J/mol.K
M ácido oleico	282,46 g/mol

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
r	Coefficiente de Correlação de Pearson
R^2	Coefficiente de Determinação
K_{232}	Coefficiente de Extinção a 232 nm
K_{270}	Coefficiente de Extinção a 270 nm
d_{20}^{20}	Densidade Relativa
Ea	Energia de Ativação de Fluxo
K	Índice de Consistência de um Fluido (Lei da Potência)
n	Índice de Escoamento (Lei da Potência)
n_D^{20}	Índice de Refração
mPa.s	Mili Pascal por Segundo
mEq	Miliequivalentes
Pa	Pascal
rpm	Rotações por Minuto
T	Temperatura (Kelvin)
σ	Tensão de Corte ou de Cisalhamento
ΔK	Variação do Valor Absoluto da Extinção Específica
$\dot{\gamma}$	Velocidade de Corte ou de Cisalhamento
$\eta(\dot{\gamma})$	Viscosidade

CAP. 1 – INTRODUÇÃO

O azeite, produto alimentar extraído a partir da azeitona por processos mecânicos, é um componente essencial da dieta mediterrânea que é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como o regime nutricional mais equilibrado. A dieta mediterrânea é caracterizada pelo consumo elevado de alimentos de origem vegetal, pelo consumo moderado de peixe, aves, laticínios e ovos, pelo consumo de pequenas quantidades de carnes vermelhas, e, entre outros, também pela utilização do azeite como principal fonte de gordura.

O azeite é reconhecido como um alimento extremamente saudável devido à sua riqueza nutricional em antioxidantes, minerais, ácidos gordos monoinsaturados, ácidos gordos essenciais, e vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E. O consumo significativo de azeite está relacionado com as suas características sensoriais e propriedades nutricionais benéficas para a saúde. É utilizado para tempero bem como em processos de culinária tais como a cozedura, o aquecimento por micro-ondas e a fritura, por exemplo.

Os processos de fritura são bastante utilizados pela sua rapidez, pelo uso abrangente a uma diversidade de alimentos e pelas características apelativas dos alimentos fritos tais como o sabor, a textura e a aparência. Nesta técnica culinária são atingidas temperaturas elevadas (aproximadamente 180°C), sendo, por isso, mais adequada a utilização de óleos monoinsaturados como o azeite ou o óleo de amendoim uma vez que são mais resistentes às altas temperaturas. Para estes óleos, os processos de degradação ocorrem a temperaturas superiores à temperatura de fritura. Em contraste, os óleos polinsaturados como o óleo de girassol, de soja ou de milho degradam-se mais rapidamente e a temperaturas inferiores a 180°C.

As diversas técnicas de cozinha incluem uma variedade de reações químicas que podem ser categorizadas como hidrólise, oxidação, e polimerização e, como consequência, conduzem à perda das características organolépticas e valor nutricional do azeite. Com tantas alterações ocasionadas pelo processo de fritura dos alimentos, e uma vez que estas alterações podem ter consequências quer ao nível nutritivo quer ao nível da saúde do consumidor, é conveniente o uso de métodos analíticos capazes de medir a intensidade da degradação e a qualidade do azeite.

A viscosidade (um parâmetro reológico) é um importante descritor físico no controlo de qualidade do azeite, destacando-se igualmente a sua correlação com a análise sensorial e a sua relevância na avaliação estrutural deste produto alimentar. Um dos fatores que mais influenciam a viscosidade é a temperatura, constituindo esta dependência uma forma de avaliar as variações microestruturais do azeite e assim determinar se o azeite é adequado para fritura.

Com o presente trabalho pretende-se estudar o efeito da temperatura sobre o azeite virgem extra, nomeadamente durante alguns processos térmicos tradicionalmente associados às técnicas de culinária, avaliando a qualidade dos azeites estudados através de parâmetros reológicos, físico-químicos e cromatográficos.

2.1 AZEITE

O azeite é um óleo (gordura que à temperatura ambiente se apresenta no estado líquido) obtido exclusivamente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*), mediante extração mecânica das azeitonas em condições que não provocam a alteração do azeite. Não é permitida a extração por solvente, nem a reesterificação ou a mistura com óleos de outra natureza. De um modo geral, apresenta cor verde amarelada (Codex Alimentarius, 2001, Belitz et al., 2009, International Olive Council, 2015 e Casa do Azeite, 2014).

O tempo de prateleira do azeite é muito variável visto que depende de inúmeros fatores, sendo por isso difícil definir uma duração real (ASAE, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional de Estatística, 2013, o consumo humano de azeite apresentou uma tendência de crescimento médio anual de 2%, entre 2008 e 2011, sendo que cada habitante consumiu, em média, 7,8 kg de azeite no ano de 2011.

2.1.1. AZEITES DOP

Os azeites virgem ou virgem extra de Denominação de Origem Protegida (DOP) têm origem numa área geográfica delimitada, com solos e clima característicos, sendo elaborados de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações e obrigações referentes a (i) variedades de azeitona que devem ser provenientes de oliveiras localizados na área geográfica de produção e serem utilizadas nas proporções preconizadas, (ii) condições de apanha e transporte para o lagar, (iii) condições de laboração e acondicionamento e (iv) características do produto final (Regulamento (CE) n.º 510/2006 do Conselho, de 20 de Março e CONFAGRI, 2009a)

Em Portugal, existem seis zonas DOP para azeites: Azeites de Moura, Azeites do Norte Alentejano, Azeites do Alentejo Interior, Azeites da Beira Interior (integram dois tipos regionais, os Azeites da Beira Alta e os Azeites da Beira Baixa), Azeites de Trás-os-Montes e Azeites do Ribatejo (Regulamento (CE) n.º 1107/96 da Comissão, de 12 de Junho e CONFAGRI, 2009a).

Em seguida, apresentam-se mais pormenorizadamente os azeites DOP mais relevantes neste projeto.

2.1.1.1. DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA DE MOURA

O azeite desta região, situada na margem esquerda do rio Guadiana (Figura 1), é proveniente da associação das azeitonas Cordovil (entre 35 a 40%), Verdeal (com um máximo de 15 e 20%,) e Galega (entre 40 e 50%). É um azeite muito frutado, amargo e picante, sendo de cor amarela esverdeada (Pinheiro e Silva, 2005 e AFGalimantar, 2015).

Os azeites de Moura apresentam acidez baixa ou muito baixa e são ricos em ácidos gordos monoinsaturados. Na extração deste azeite apenas se utilizam azeitonas colhidas de árvores em plena maturação (Freitas, 2013).

2.1.1.2. DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA DO NORTE ALENTEJANO

Os azeites do Norte Alentejano, provenientes de algumas zonas de Évora, Estremoz, Borba e Reguengos de Monsaraz até Elvas, Campo Maior e Portalegre (Figura 1), são azeites ligeiramente espessos, frutados e de coloração amarela a verde (Freitas, 2013 e AFGalimentar, 2015).

O Regulamento (CE) n.º 708/2005 da Comissão, de 10 de Maio estabelece as proporções das variedades de azeitonas que podem ser utilizadas:

(i) A variedade obrigatória é a Galega que constitui a cultivar predominante, devendo-se utilizar no mínimo 65%;

(ii) As variedades toleradas consistem na Carrasquenha, Redondil, Azeiteira e Blanqueta (com máximo de 5%), podendo ainda ser utilizada a Cobrançosa com um máximo de 10%.

Citando este mesmo Regulamento, «(...) No entanto, outras variedades tradicionais podem ser utilizadas, num máximo de 5%, desde que autorizadas pelo agrupamento de produtores gestor da DOP».

2.1.1.3. DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA DO RIBATEJO

Os azeites do Ribatejo são doces, com sabor a frutos verdes e atributos amendoados, possuem aromas frutados e uma cor amarela, por vezes ligeiramente esverdeada (Regulamento (CE) n.º 510/2006 do Conselho, de 20 de Março e AFGalimentar, 2015).

O Regulamento (CE) n.º 510/2006 do Conselho, de 20 de Março estabelece que as proporções das variedades Galega e/ou Lentisca sejam no mínimo 55 % e Cobrançosa, máximo 45 %. Adicionalmente admitem-se outras variedades (com exceção da Picual, que é proibida), numa percentagem máxima de 5 %.

2.1.1.4. DENOMINAÇÃO DE ORIGEM PROTEGIDA DE TRÁS-OS-MONTES

A região DOP de Trás-os-Montes é delimitada pelo distrito de Bragança, engloba Alfandega da Fé, Vila Flor, Mirandela até Valpaços e Murça (Figura 1). Os azeites produzidos são de textura fina e caracterizam-se pelos aromas acentuados de frutos secos. Apresentam características sensoriais de doce, verde, amargo e picante (AFGalimentar, 2015).

As cultivares permitidas que podem ser utilizadas são a Cobrançosa, a Verdeal e a Madural. Contudo, podem ser também incluídas outras cultivares numa percentagem inferior a 10% (Pinheiro e Silva, 2005 e Peres et al., 2011).

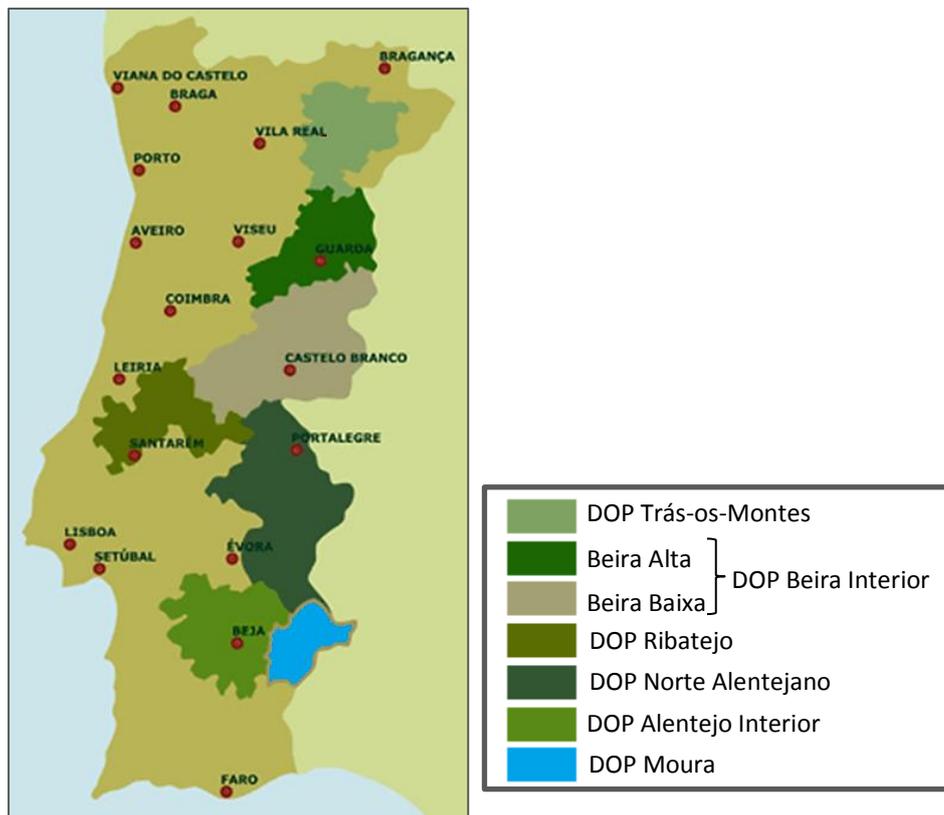


Figura 1 - Regiões DOP (adaptado da página Web VIAZ, 2014)

2.1.2. AZEITES DE AGRICULTURA BIOLÓGICA E DE QUINTA

Azeite de Agricultura Biológica - Azeite proveniente de olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico regulamentado pela União Europeia. Um dos princípios básicos deste modo de produção é desenvolver a fertilidade do solo e, a partir daí, melhorar a qualidade e quantidade das produções obtidas. A aplicação de fertilizantes e de pesticidas está limitada a um conjunto de produtos definidos pela Comissão Europeia. A rotulagem destes azeites deve conter, para além da informação obrigatória constante nos outros azeites, a menção "Agricultura Biológica", "Sistema de Controlo CE", indicação da entidade de controlo e certificação e, facultativamente o selo comunitário de agricultura biológica (CONFAGRI, 2009a).

Azeite de Quinta - define-se como um produto em que todas as operações desde o cultivo da oliveira até ao acondicionamento do azeite são efetuadas na área geográfica da exploração da agrícola (CONFAGRI, 2009a e Herdade de Vale de Arca, 2015).

2.1.3. CLASSIFICAÇÃO DO AZEITE

A classificação atribuída a cada azeite está dependente do tipo de processamento efetuado bem como das características organoléticas e químicas do produto final, tais como a composição em ácidos gordos, conteúdo de fitoquímicos, índice de peróxidos, índice de acidez, entre outros (Tabela 1).

A análise organolética exige um painel treinado de oito a doze provadores que avaliam o azeite virgem extra com recurso a treze atributos, dos quais nove são olfativos (frutado, folha verde, erva,

amêndoa, tomate, maçã, alcachofra, bagas e ervas aromáticas) e quatro são gustativos (frutado, amargo, picante e a fluidez). Estes atributos são quantitativamente avaliados obtendo-se assim um registo do perfil organolético de cada azeite (ASAE, 2014).

De acordo com a legislação vigente, as designações e definições dos azeites e óleos de bagaço de azeitona são as que se seguem:

2.1.3.1. AZEITE VIRGEM

«"Azeites virgens" são os azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos, sob condições que não provoquem alterações no azeite, e que não tenham sido submetidos a outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação ou da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza». (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII))

Estes azeites apresentam-se límpidos, com tonalidades de amarelo a verde, com odor e sabor particularizados pelas variedades autorizadas. São adequados ao consumo no seu estado natural (Codex Alimentarius, 2001).

Os azeites virgens são exclusivamente classificados e descritos do seguinte modo:

a) Azeite virgem extra

«"Azeite virgem extra" é o azeite virgem com acidez livre, expressa em termos de ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g, cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

A sua composição equilibrada determina uma estabilidade oxidativa elevada e simultaneamente efeitos positivos para a saúde (ASAE, 2014).

Este azeite é adequado ao consumo direto e ideal para temperar a cru. Os azeites virgem extra de sabor mais suave são ideais para o tempero de saladas e alimentos com sabor mais suave, bem como para a doçaria. Em contraste, os azeites virgem extra de sabor mais intenso são adequados para alimentos de sabor mais distinto e poderão ser utilizados para a confeção de molhos (Casa do Azeite, 2014).

b) Azeite virgem

«"Azeite virgem" é o azeite virgem com acidez livre, expressa em termos de ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g, cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

O azeite virgem adequa-se ao consumo direto, sendo também apropriado para assados, sopas, refogados ou marinadas (Peri, 2014 e Casa do Azeite, 2014).

c) Azeite lampante

«"Azeite lampante" é o azeite virgem com acidez livre, expressa em termos de ácido oleico, superior a 2 g por 100 g e/ou cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão,

nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

O azeite lampante não é adequado ao consumo, destina-se à refinação ou para uso técnico (International Olive Council, 2015).

2.1.3.2. AZEITE REFINADO

«"Azeite refinado" é o azeite obtido por refinação do azeite virgem, com acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

O processo de refinação não pode provocar alterações na estrutura inicial dos ácidos gordos. Os azeites refinados são de coloração amarela e apresentam-se límpidos, sem sedimentos, sem odores ou gosto específicos (Codex Alimentarius, 2001).

2.1.3.3. AZEITE – COMPOSTO POR AZEITE REFINADO E AZEITE VIRGEM

O Regulamento (CE) n.º 1513/2001 do Conselho, de 23 de Julho estabelece que o nome genérico "azeite" é utilizado para designar a categoria de azeite que é composto por azeite refinado e azeite virgem, com acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, previstas para esta categoria.

O azeite refinado é enriquecido com azeite virgem para a manutenção das suas propriedades antioxidantes e, conseqüentemente, melhorar a vida útil requerida para o alimento frito e a estabilidade do produto frito (Sanibal e Mancini-Filho, 2002).

É ideal para frituras dada a sua elevada resistência às altas temperaturas e tem um ponto de fumo bastante elevado o que permite aumentar o seu número de utilizações (Peri, 2014 e Casa do Azeite, 2014).

2.1.3.4. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA BRUTO

«"Óleo de bagaço de azeitona bruto" é o óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solventes ou por processos físicos, ou óleo correspondente, com exceção de certas características específicas, a um azeite lampante, com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

2.1.3.5. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA REFINADO

«"Óleo de bagaço de azeitona refinado" é o óleo obtido por refinação de óleo de bagaço de azeitona bruto, com acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

Os azeites pertencentes a esta categoria são límpidos, sem sedimentos, sem odores ou sabores específicos e possuem uma coloração amarela ou amarela acastanhada (Codex Alimentarius, 2001).

2.1.3.6. ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA

«Óleo de bagaço de azeitona" é o óleo obtido por lotação de óleo de bagaço de azeitona refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g, e cujas outras características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75.º, n.º 2, para esta categoria» (Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro, (Parte VIII)).

Tabela 1 – Alguns parâmetros específicos das categorias de azeite (fonte: Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro)

Categoria	I. Acidez (% ácido oleico)	I. Peróxidos (mEq O ₂ /kg)	Espectrometria (UV)			Avaliação Organolética	
			K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Mediana do frutado (Mf)	Mediana dos defeitos (Md)
Azeite Virgem Extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,5	≤ 0,22	≤ 0,01	Mf > 0	Md = 0
Azeite Virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Mf > 0	Md ≤ 3,5
Azeite Lampante	> 2,0	-	-	-	-	-	Md > 3,5
Azeite Refinado	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 1,10	≤ 0,16	-	-
Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 0,90	≤ 0,15	-	-
Óleo de bagaço de azeitona bruto	-	-	-	-	-	-	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	-	-	-	≤ 2,00	≤ 0,20	-	-
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 1,70	≤ 0,18	-	-

2.1.4. COMPOSIÇÃO

As cultivares de azeitonas utilizadas e o seu estado de maturação condicionam a composição do azeite obtido, em particular pela presença de compostos fenólicos que decrescem com a maturação, e pelo conteúdo em ácidos gordos (Matos et al., 2007 e Garcia et al., 2012). Paralelamente, além dos fatores agronómicos, a composição depende também de fatores ambientais e de fatores relacionados com a extração. Todos estes afetam as características nutricionais, físico-químicas e organoléticas do azeite (Sousa et al., 2014).

O azeite virgem extra inclui, essencialmente, dois grupos de compostos, os maioritários, sendo eles os triacilgliceróis (representando 97% a 99% da massa total) e os ácidos gordos livres, e os minoritários (representando 1% a 3% da massa total) (Peri, 2014).

2.1.4.1. TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GORDOS

Os triacilgliceróis são os componentes predominantes no azeite, formados por um conjunto de três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol. Os ácidos gordos que formam parte da molécula de triacilglicerol são maioritariamente monoinsaturados (ácido oleico), existindo quantidades menores de ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico e ácido α -linolénico) e de ácidos gordos saturados (ácido palmítico e ácido esteárico). De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, a composição em ácidos gordos é de 55% a 83% de ácido oleico, 3,5% a 21% de ácido linoleico, 7,5% a 20% de ácido palmítico, 0,5% a 5% de ácido esteárico e inferior ou igual a 1% de ácido α -linolénico. Esta composição rica em ácidos gordos monoinsaturados em oposição a ácidos gordos polinsaturados aumenta a estabilidade oxidativa do azeite, uma vez um maior número de ligações duplas na cadeia de ácidos gordos está associado a uma maior suscetibilidade à oxidação. Adicionalmente, os compostos fenólicos contribuem positivamente para a resistência à oxidação (Capannesi et al., 2000, Owen et al., 2000, Bester et al., 2008 e Oliveira et al., 2010).

2.1.4.2. COMPOSTOS MINORITÁRIOS

Outros constituintes importantes presentes no azeite incluem os compostos polares, não polares e anfipáticos. Estes componentes minoritários também contribuem para as características sensoriais, bem como para as propriedades benéficas para a saúde e são essencialmente hidrocarbonetos, tocoferóis, compostos fenólicos, fitoesteróis, clorofilas, carotenóides, ésteres e outros compostos voláteis (Owen et al., 2000, Canciam, 2010, Mello e Pinheiro, 2012 e Rios et al., 2013). Estes componentes minoritários, na sua grande maioria perdem-se durante os processos de refinação, não estando presentes nos azeites refinados (Costa, 2012).

2.1.4.2.1. Fitoesteróis

Os fitosteróis são álcoois insaturados de carácter lipofílico. Embora estes compostos representem a parte menor de lípidos nos óleos vegetais, a sua quantificação pode ser útil para inferir sobre a qualidade e autenticidade do azeite visto que cada óleo tem um perfil de esteróis característico. São componentes importantes para a estabilidade do azeite uma vez que a temperaturas elevadas atuam como inibidores de reações de polimerização (Matos et al., 2007 e Dias, 2009).

O esterol que se encontra em maior quantidade no azeite é o β – sitosterol, representando 90 a 95% do total de esteróis. Os valores de esteróis totais exibem uma tendência decrescente à medida que ocorre a maturação das azeitonas (Matos et al., 2007 e Pedrosa, 2010).

De acordo com o Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro, o colesterol pode estar presente no azeite virgem extra em quantidades inferiores ou iguais a 0,5%.

2.1.4.2.2. Substâncias responsáveis pelo cheiro e sabor

O azeite apresenta um aroma particular devido à grande quantidade de compostos aromáticos de diversa natureza. Os compostos voláteis e alguns compostos fenólicos como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, fenóis, entre outros, são responsáveis pelo aroma do azeite.

Os fenóis presentes no azeite determinam as características de amargo e picante (Mello e Pinheiro, 2012 e Sousa et al., 2014). Assim, azeites com elevado teor de compostos fenólicos são de uma maneira geral amargos e picantes. A oleuropeína é o principal composto fenólico da azeitona, sendo hidrolisada durante a maturação em várias moléculas mais simples responsáveis pelo sabor amargo. Da mesma forma, azeites que resultam da extração de azeitonas demasiado verdes apresentam sabores mais adstringentes e amargos. As agliconas do ligstrosídeo são responsáveis pelo sabor picante, por isso, azeites com elevado teor deste composto são mais pungentes (Garcia et al., 2012).

2.1.4.2.3. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos que contêm apenas átomos de carbono e hidrogénio, formados durante a síntese dos ácidos gordos e compreendem o esqualeno e o β -caroteno (Freitas, 2013).

O principal hidrocarboneto no azeite é o esqualeno, que consiste num hidrocarboneto triterpeno que exerce uma atividade antioxidante por reação com os radicais de oxigénio, protegendo a pele contra os raios UV. O azeite virgem extra contém 200 a 700 mg de esqualeno por 100 g de óleo, enquanto o azeite refinado contém cerca de 25% menos (Allouche et al., 2007).

Estão presentes no azeite virgem extra outros hidrocarbonetos úteis, como por exemplo o β -caroteno, mesmo que em pequenas quantidades.

2.1.4.2.4. Pigmentos

A cor do azeite virgem extra varia do verde ao amarelo devido à prevalência de substâncias corantes. As clorofilas e os seus produtos de oxidação, feofitinas, são responsáveis pela cor esverdeada e os carotenóides (luteína, β -caroteno e diversas xantofilas) atribuem a cor amarelada aos azeites. (Dias, 2009 e Costa, 2012) Estes pigmentos contribuem para a estabilidade do azeite protegendo-o da foto-oxidação (Pedrosa, 2010).

2.1.4.2.5. Tocoferóis

Os tocoferóis são fenóis lipofílicos que possuem uma ação antioxidante.

O α – tocoferol é a isoforma mais abundante de vitamina E no azeite virgem extra, representando aproximadamente 95% dos tocoferóis totais (Tasioula-Margari e Okogeri, 2001, Allouche et al., 2007, Matos et al., 2007 e Dias, 2009). Quando a atividade da fração fenólica é reduzida e os produtos primários de auto-oxidação alcançam uma concentração crítica, o α – tocoferol torna-se eficaz. Nas etapas iniciais de auto-oxidação, o α – tocoferol pode atuar como um pró-oxidante, dependendo da sua concentração. O α – tocoferol pode também ter um efeito sinérgico com alguns compostos fenólicos. Todavia, os compostos fenólicos parecem ser mais eficazes na proteção do azeite contra a oxidação do que o α – tocoferol (Bester et al., 2008 e Silva et al., 2010).

O α - tocoferol possui uma ação preventiva contra as espécies reativas de oxigénio em sistemas biológicos como plasma, membranas celulares e tecidos. Também protege a lipoproteína de baixa

densidade (LDL) da oxidação, que está implicada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Silva et al., 2010 e Garcia et al., 2012).

2.1.4.2.6. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis podem ser definidos como substâncias que possuem um anel benzênico ligado a um ou mais grupos hidroxílicos. A concentração média de compostos fenólicos no azeite não é uniformizada e pode variar, por exemplo, entre 200 e 1500 mg/kg (Allouche et al., 2007) ou entre 326 e 1110 mg/kg (Garcia et al., 2012).

O teor de compostos fenólicos é bastante influenciado pelo tipo e pelo estado de maturação das cultivares utilizadas, pelos fatores ambientais e pelas condições dos processos de extração e armazenamento (Capannesi et al., 2000 e Quiles et al., 2002).

Paralelamente aos tocoferóis, os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes responsáveis pela resistência do azeite à oxidação, melhorando a sua estabilidade, bem como pela atribuição de propriedades organoléticas (Capannesi et al., 2000, Mosca et al., 2000, Quiles et al., 2002, Allouche et al., 2007, Bester et al., 2008, Casal et al., 2010 e Navarra et al., 2011). Alguns destes compostos podem inibir eficientemente a oxidação por uma variedade de mecanismos baseados na eliminação de radicais, transferência de átomos de hidrogénio e ação quelante de metais. No entanto, estes fenóis são consumidos após reações com as espécies radicalares (Allouche et al., 2007, Krichene et al., 2010 e Barros et al., 2013).

Os compostos fenólicos identificados no azeite virgem podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos (ácido benzóico e ácido cinâmico), álcoois fenólicos (hidroxitiroso e tirosol), flavonoides (luteolina e apigenina), lignanas (pinoresinol e acetoxipinoresinol) e secoiridóides (oleuropeína e ligstrosídeo) (Owen et al., 2000, Hrnčirik e Fritsche, 2004, Bester et al., 2008 e Krichene et al., 2010).

O ligstrosídeo juntamente com a oleuropeína formam a parte principal da fração fenólica, sendo este último um componente exclusivo das azeitonas e do azeite. Existem outros compostos fenólicos simples presentes, tais como o ácido cafeico, ácido vanílico e ácido ferúlico que têm um efeito protetor sobre o α -tocoferol e lignanas (Hrnčirik e Fritsche, 2004 e Bester et al., 2008).

2.1.5. PROCESSO DE EXTRAÇÃO

A produção do azeite virgem pode ser dividida em 4 etapas compostas por diversos processos: (i) cultivo, (ii) colheita e moenda, (iii) preparação e obtenção de azeite, e (iv) armazenamento e acondicionamento (Figuras 3 e 4).

2.1.5.1. COLHEITA

A colheita das azeitonas deve ser efetuada apenas quando estas estão na fase ideal de maturação e em bom estado sanitário. O estado de maturação depende da combinação de fatores genéticos, ambientais e culturais. As mudanças mais aparentes são o aumento do tamanho das azeitonas e alterações como a cor da casca que, em muitos casos, segue uma sequência de quatro etapas:

1. Estado verde: pele uniformemente verde;

2. Estado verde-claro: a coloração verde progressivamente torna-se mais clara;
3. Estado roxo: a pigmentação torna-se roxa avermelhada, afetando na maioria das vezes apenas o ápex da azeitona. Depois, com o amadurecimento, essa cor estende-se por toda a superfície da azeitona, que tem tendência a escurecer até se tornar preta.
4. Estado preto: toda a pele apresenta-se uniformemente preta e a azeitona pode ser considerada demasiado maturada. No estágio final da maturação, pigmentação também pode afetar a polpa até ao caroço.

Contudo, estas alterações da cor não podem ser consideradas regra geral porque o processo de pigmentação é influenciado por diversos fatores, como o clima e a cultivar. Em geral, a colheita deve ser efetuada no estado roxo.

2.1.5.2. TRANSPORTE E ARMAZENAGEM

No período desde a colheita até à moenda é importante não só controlar a temperatura mas também precaver danos nas azeitonas durante o seu transporte e armazenamento, uma vez que condições inapropriadas podem provocar reações indesejáveis responsáveis pelo detrimento da qualidade do produto. Esmagar ou amolgar as azeitonas incita a rutura das estruturas celulares e, desta forma, ocorre a mistura das gotículas de azeite (originalmente armazenado nos vesículos) com outros componentes celulares, nomeadamente enzimas. Estas condições, aliadas ao contacto entre o oxigénio e o azeite, aceleram o processo de deterioração. Adicionalmente, devido à presença de açúcares pode também ocorrer fermentação por microrganismos com a formação de etanol, ácido acético e acetato de etilo, contribuindo para a presença de características desagradáveis. Todos estes fatores estão associados à ocorrência de reações de lipólise e oxidação lipídica, originando, respetivamente, ácidos gordos livres e hidroperóxidos que desempenham um papel importante na qualidade do azeite (Navarra et al., 2011).

2.1.5.3. LIMPEZA E LAVAGEM

Primeiramente são removidas as azeitonas danificadas, os materiais e resíduos vários do campo como pedras, folhas e ramos, seguindo-se a lavagem das azeitonas com água potável a fim de remover resíduos de pó e solo. A lavagem é efetuada com água à temperatura ambiente (entre os 20°C e os 24°C) para facilitar o controlo da temperatura durante as fases seguintes.

2.1.5.4. MOENDA

O objetivo da moenda é reduzir as azeitonas a uma pasta homogénea através da quebra do caroço, da pele e da polpa. A pasta de azeitona formada consiste numa mistura semilíquida de dois tipos de sólidos diferentes (fragmentos sólidos dos caroços e partes moles resultantes da pele e da polpa) e dois tipos de líquidos imiscíveis (água e azeite). Numa fase posterior o azeite é separado da água e dos constituintes sólidos.

A moenda deve reduzir a polpa até uma camada fina para obter a libertação completa do azeite presente nos vacúolos e, por outro lado, reduzir os caroços a fragmentos relativamente grandes para garantir uma drenagem eficaz. Os fragmentos dos caroços constituem uma estrutura rígida na pasta de azeitona, facilitando a drenagem e a separação do líquido dos componentes sólidos. Durante a termobatedura estes fragmentos também contribuem para a fricção e rutura das células, coadjuvando a libertação do azeite. Em contraste, a quebra dos caroços até dimensões muito reduzidas pode gerar pó,

provocando o entupimento do tanque de decantação e, por conseguinte, reduzindo o rendimento da extração.

Uma trituração intensa provoca uma redução significativa do tamanho dos tecidos e a rutura de material celular. Ocorre uma maior libertação dos compostos fenólicos e as atividades enzimáticas são ativadas com formação de agliconas de oleuropeína, que são parcialmente solúveis no azeite. Assim, como consequência, o azeite formado apresenta maior amargura e características picantes, bem como um maior teor de antioxidantes.

Face ao exposto, uma moenda intensa é adequada a cultivares com um baixo teor de compostos fenólicos, podendo resultar num azeite com amargura e pungência excessivas. Uma trituração suave pode resultar num azeite com um perfil sensorial desinteressante. Desta forma, a intensidade deste processo deve ser considerada um parâmetro de controlo importante na produção do azeite virgem extra.

2.1.5.5. TERMOBATEDURA

O objetivo desta etapa é facilitar a separação do azeite nas etapas subsequentes (decantação e centrifugação).

Durante a termobatedura, a pasta de azeitona é batida e aquecida numa termobatedeira onde as gotículas de azeite se juntam a gotas maiores, incitando mudanças reológicas e, por conseguinte, as fases separam-se. Ocorrem fenómenos físicos e bioquímicos complexos que afetam o rendimento da extração bem como a qualidade nutricional e sensorial do azeite. Como por exemplo, os processos de natureza mecânica para além de misturar, provocam a rutura das células, enquanto os processos físicos consistem nas trocas de calor e em fenómenos de difusão dos compostos recém - formados entre as fases aquosa e oleosa. Adicionalmente, ocorrem reações enzimáticas que causam mudanças no equilíbrio de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Nesta etapa o binómio tempo-temperatura deve ser escolhido de modo a maximizar os efeitos desejados e minimizar os indesejáveis. As temperaturas devem estar compreendidas entre os 24°C e os 27°C. O aumento da temperatura facilita a separação de fases bem como os fenómenos de difusão. No entanto, temperaturas excessivamente altas causam efeitos negativos na qualidade do azeite devido à oxidação e evaporação de componentes voláteis.

A pasta é depois prensada por centrifugação.

2.1.5.6. DECANTAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO

A pasta de azeitona, resultante das etapas de moenda e termobatedura, consiste numa mistura de três fases (em ordem de densidade decrescente):

- A "fase de sólidos insolúveis" (representa entre 25 a 30% da massa da pasta) consiste em componentes orgânicos semissólidos e fragmentos dos caroços (Figura 2);
- A "fase aquosa" (50 a 60 % da massa total da pasta de azeitona) consiste em água e componentes solúveis em água (sais, açúcares simples e compostos fenólicos simples) (Figura 2);
- A "fase oleosa" consiste em triacilgliceróis e componentes menores, sendo os últimos uma mistura complexa de componentes lipofílicos, hidrofílicos e anfipáticos, com relevância para a qualidade sensorial e nutricional (Figura 2).

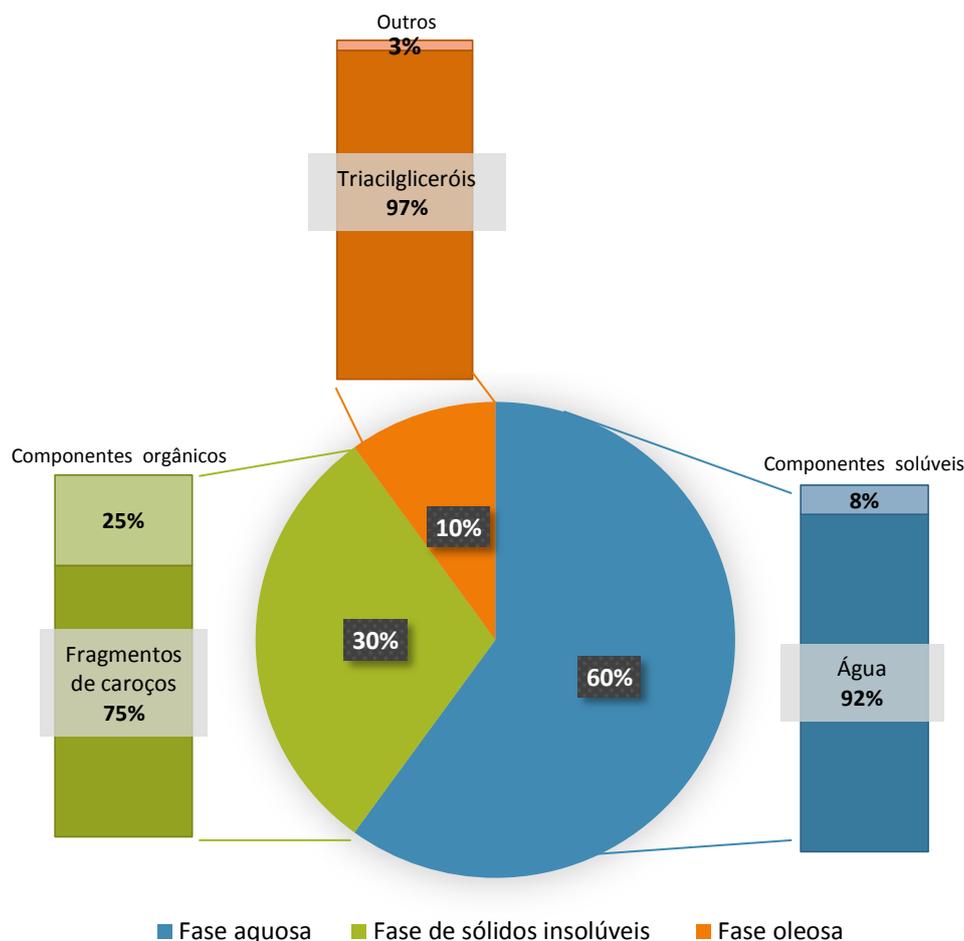


Figura 2 - Composição da pasta de azeitona (adaptado de Peri, 2014)

O objetivo desta etapa prende-se com a separação destas três fases de forma a recuperar a maior quantidade de azeite possível da pasta de azeitona. A decantação, considerando fatores operacionais, ambientais e económicos, pode ser efetuada em três ou em duas fases.

Este processo ocorre a temperaturas entre os 22°C e os 24°C.

Decantador de três fases

A primeira centrifugação é efetuada num decantador de três fases no qual as fases são separadas de acordo com as suas diferentes densidades (fase oleosa < fase aquosa < fase de sólidos insolúveis). Os sólidos insolúveis são descartados como bagaço e, uma vez que possui um baixo conteúdo de água, pode ser reutilizado para fracionamento adicional incluindo a extração de azeite residual em refinarias (Figura 3).

Decantador de duas fases

O sistema de duas fases necessita apenas de uma centrifugação e não produz águas residuais em grande quantidade. É, por conseguinte, menos dispendioso em termos de investimento e custos operacionais do que o sistema trifásico.

Deste processo resultam duas fases, uma fase oleosa e outra fase aquosa com sólidos insolúveis (Figura 4). O bagaço formado apresenta uma elevada quantidade de água, não sendo por isso recuperado facilmente.

2.1.5.7. FILTRAÇÃO

Existem partículas pequenas suspensas no azeite virgem, mesmo após a centrifugação final, que contêm água e enzimas que podem prejudicar a qualidade do azeite. As partículas suspensas não removidas podem aglomerar e flocular, formando um depósito no fundo dos recipientes de armazenamento. Este depósito pode ser sujeito a deterioração enzimática e, no pior dos casos, pode ocorrer o desenvolvimento de microrganismos que aceleram a deterioração do azeite.

Estas partículas são muitas vezes mencionadas como uma das principais causas de defeitos sensoriais.

O azeite virgem filtrado não forma depósitos nas garrafas e tem uma melhor aparência e cor, aumentando o grau de satisfação do consumidor.

A separação por filtração deve-se a um mecanismo de crivagem com base na diferença de tamanho entre as partículas em suspensão e o diâmetro dos poros do meio filtrante.

A taxa de filtração é inversamente proporcional à viscosidade do azeite. Assim o aumento da temperatura provoca uma diminuição na viscosidade e, conseqüentemente, um aumento da taxa de filtração. A temperatura ideal para a filtração do azeite virgem extra situa-se entre os 22°C e os 24°C.

Segue-se o arrefecimento a cerca de 16°C e a transferência para os tanques de armazenamento.

2.1.5.8. ARMAZENAGEM

O armazenamento é fundamental para a manutenção da qualidade do azeite virgem extra. Durante esta etapa podem ser iniciados processos oxidativos, nomeadamente a auto-oxidação, causada por agentes físicos ou químicos (por exemplo aquecimento ou presença de metais), e a foto-oxidação, resultante da exposição à luz (Navarra et al., 2011).

A deterioração do azeite deve ser minimizada, evitando o aumento da temperatura e exposição ao oxigénio e à luz. A temperatura deve ser mantida dentro de uma gama adequada (de 15°C a 18°C) evitando variações bruscas. A exposição ao oxigénio pode ser evitada através da utilização de um sistema de cobertura dos tanques de armazenamento.

2.1.5.9. ACONDICIONAMENTO

Nesta última etapa o azeite virgem extra é engarrafado e posteriormente armazenado no escuro, sem contacto direto com oxigénio e sob baixas temperaturas (15°C a 18°C) até ser comercializado (ASAE, 2014).

O tipo de material da embalagem (vidro, plástico ou metal), as condições de armazenamento (luz, temperatura) e o período de armazenamento pode influenciar significativamente a qualidade do azeite (Coutelieris e Kanavouras, 2005).

O azeite virgem extra deve ser protegido de contaminantes como poeiras, oxigénio, microrganismos e produtos de degradação derivados de outros materiais de contato. Adicionalmente, a embalagem deve evitar o contacto do azeite com a luz sendo utilizados recipientes de coloração âmbar ou verde-escuro. As garrafas de vidro de cor âmbar têm o melhor efeito protetor. Os recipientes de vidro de cor verde são filtros eficazes da luz visível mas apresentam um efeito protetor baixo (Coutelieris e Kanavouras, 2005).

A colocação do azeite virgem extra nas garrafas é efetuada de forma cuidada para minimizar a turbulência e o contacto com o oxigénio.

A temperatura deve ser mantida constante (aproximadamente a 20°C) uma vez que variações bruscas são responsáveis pela alteração da viscosidade do azeite que afeta o rendimento desta etapa.

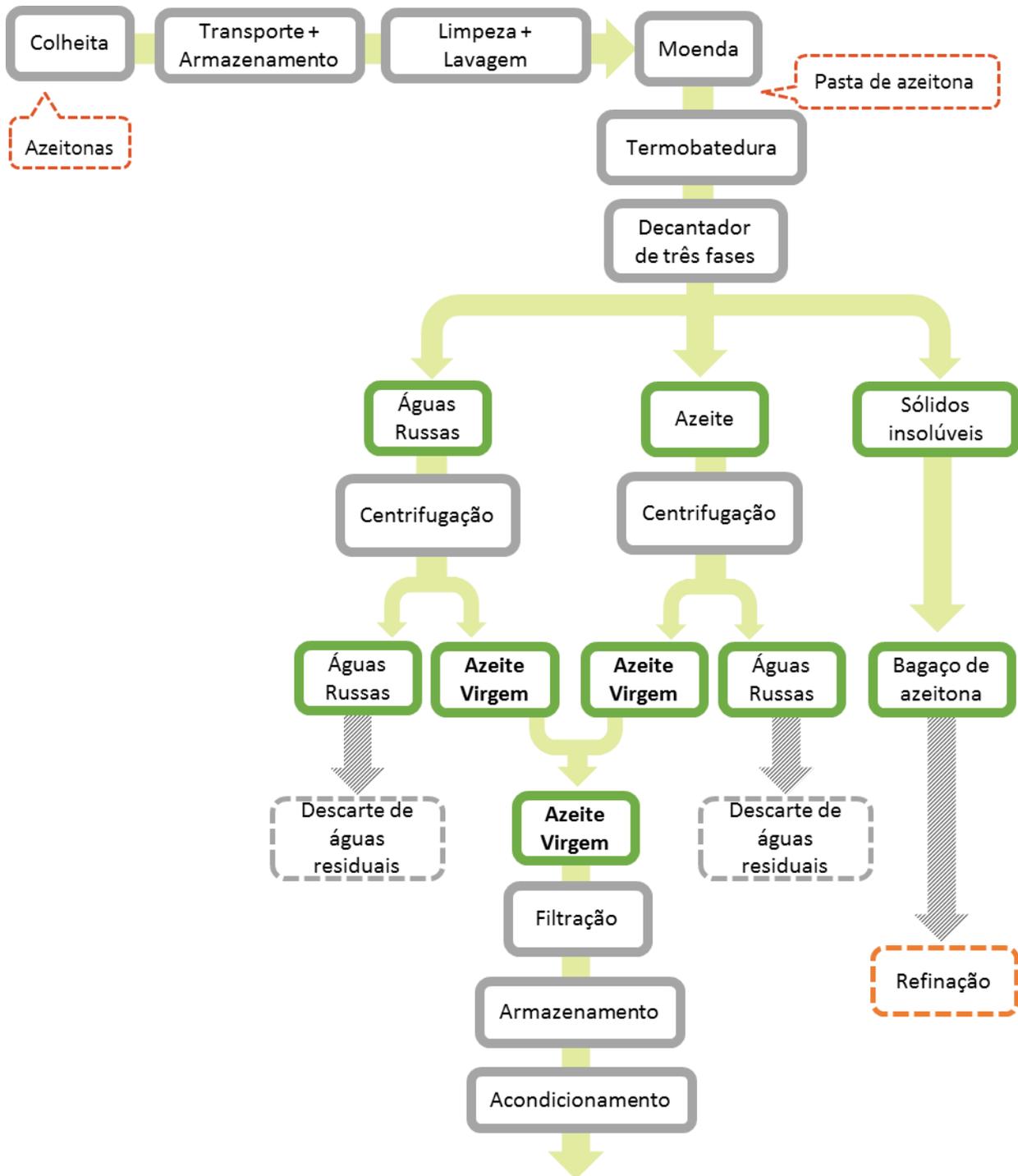


Figura 3 - Sistema de produção utilizando um decantador de três fases (adaptado de Peri, 2014)

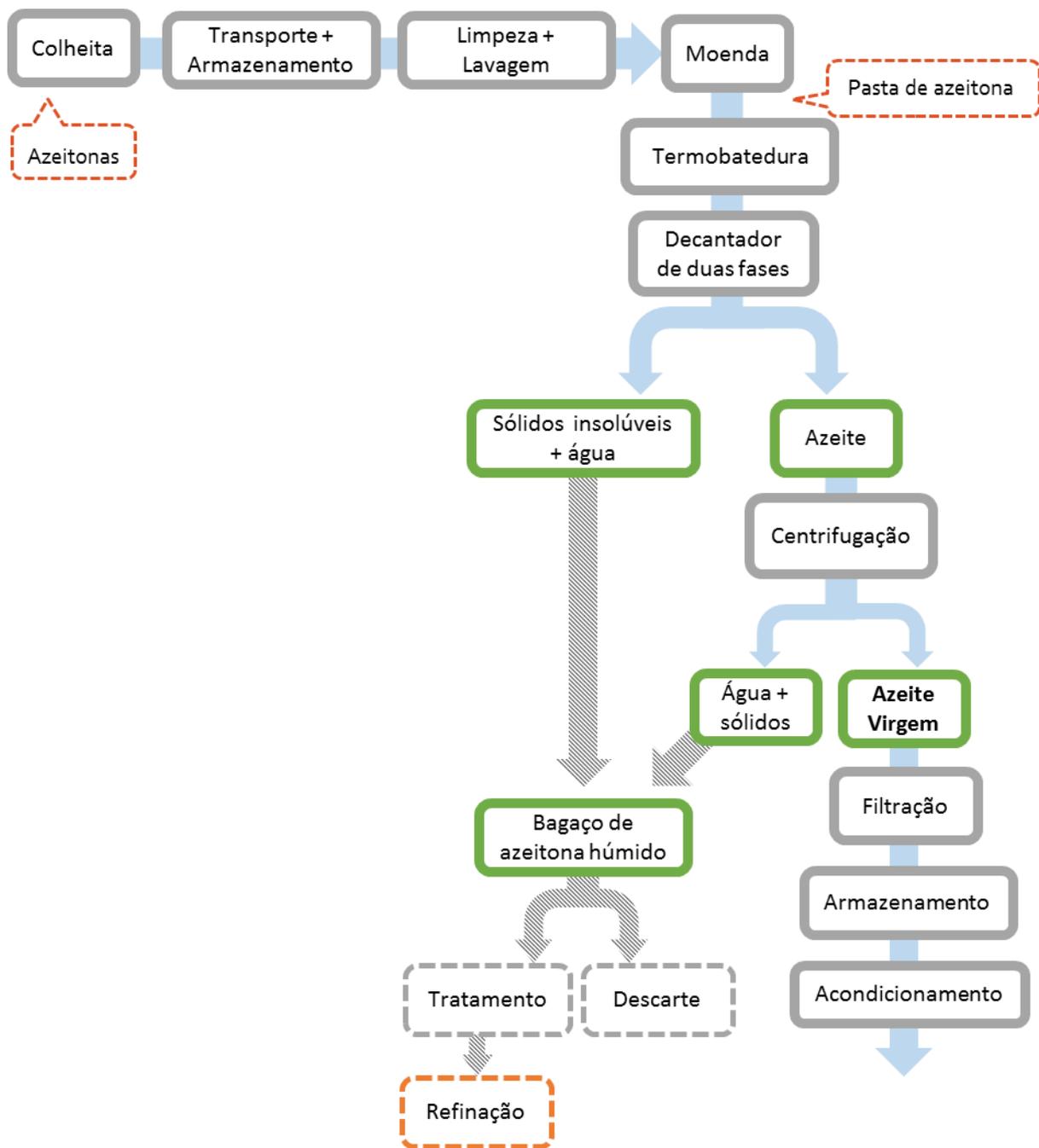


Figura 4 - Sistema de produção utilizando um decantador de duas fases (adaptado de Peri, 2014)

2.1.5.10. REFINAÇÃO

O bagaço descartado das operações de centrifugação requer um processo de extração por solvente antes da refinação.

Extração do óleo de bagaço de azeitona bruto

O bagaço de azeitona deve ser sujeito a uma etapa de secagem seguida da extração com solvente. No entanto, o bagaço proveniente do decantador de duas fases necessita de outras transformações antes de se procederem a estas etapas uma vez que este bagaço contém partículas sólidas. Neste caso, o primeiro processo da extração consiste na remoção dos fragmentos sólidos e o produto resultante é reencaminhado para a termobatedura, decantação e centrifugação. Após estes processos são obtidos separadamente três produtos (água, resíduos sólidos e bagaço de azeitona bruto).

As etapas seguintes são comuns ao bagaço de azeitona proveniente do decantador de duas ou três fases.

O bagaço é sujeito a secagem para remoção do conteúdo em água, apresentando assim condições satisfatórias para a extração com solventes. As temperaturas de secagem são elevadas, atingindo os 200°C e os 300°C, e portanto o azeite sofre degradação. Este facto é visível pelo aumento do índice de acidez, índice de peróxidos e coeficientes de extinção específicos, bem como pelo aparecimento de substâncias de coloração castanha. O bagaço seco é constituído por pó com partículas de diferentes tamanhos.

Na extração com solvente (hexano) ocorre a mistura de solventes (fase líquida) com o bagaço (fase sólida) em que o solvente penetra na fase sólida e ocorrem fenómenos de dissolução e difusão, permitindo que o óleo seja transferido das partículas para o solvente. Assim, a solução final é composta por dois componentes: (i) resíduos sólidos de bagaço seco e (ii) solução composta pelo óleo dissolvido no solvente.

Seguidamente procede-se à separação da solução final por meios mecânicos ou através da ação gravítica.

Por último, o solvente presente na mistura é evaporado sob vácuo e o óleo de bagaço de azeitona bruto é reencaminhado para a refinação.

Estes processos encontram-se esquematizados na Figura 5.

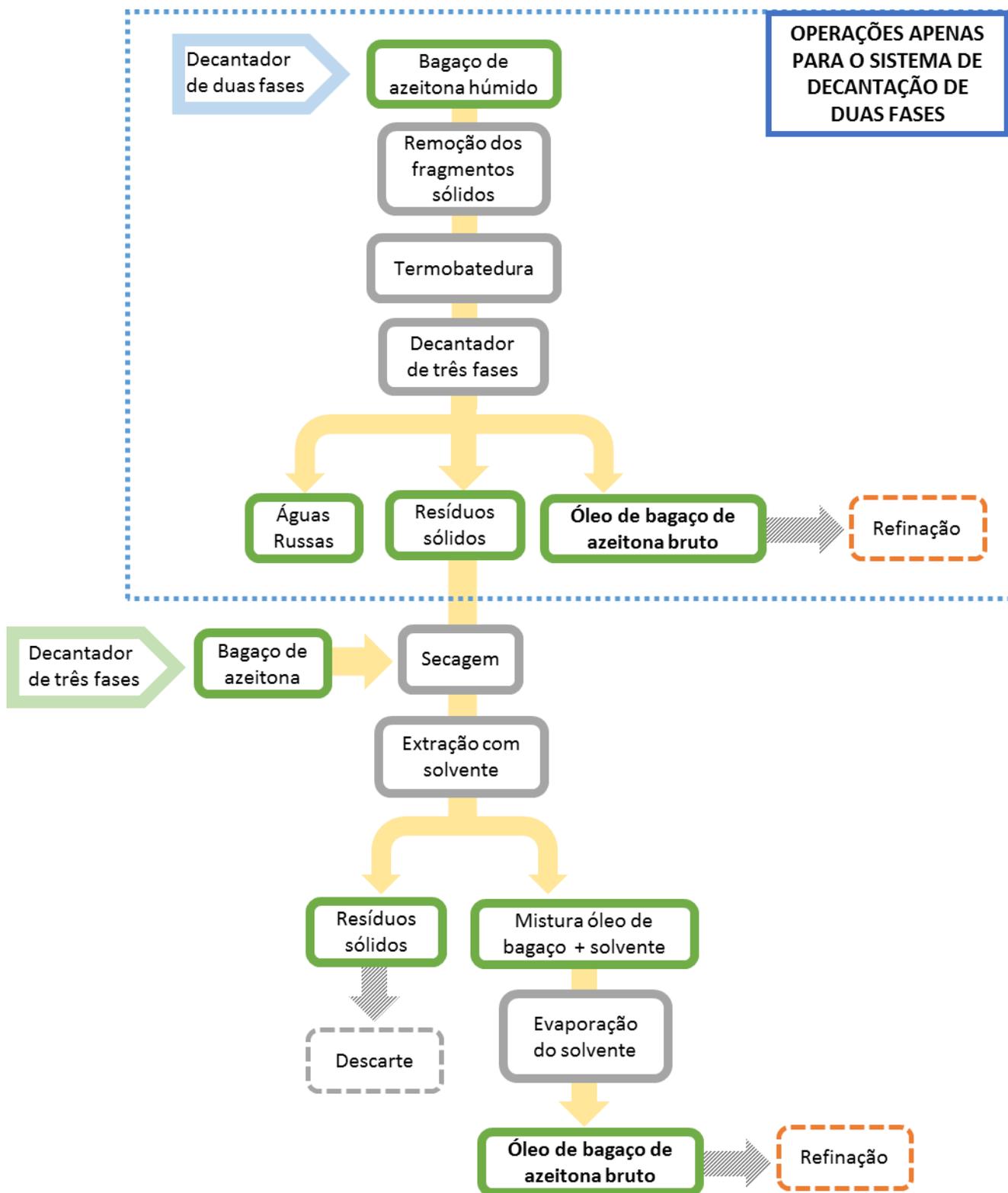


Figura 5 - Processo de extração do óleo de bagaço de azeitona bruto (adaptado de Peri, 2014)

Processo de Refinação

O azeite lampante e o óleo de bagaço de azeitona bruto devem ser refinados para poderem ser consumidos (Decreto-Lei n.º 76/2010 de 24 de Junho). No entanto, a refinação provoca a perda de compostos bioativos e antioxidantes e, por conseguinte, os azeites refinados não conservam as mesmas capacidades antioxidantes e anti – inflamatórias atribuídas aos azeites virgens (Owen et al., 2000, Casal et al., 2010, Bonnet et al., 2011, Carapinha et al., 2012 e Estruch e Salas-Salvadó, 2013).

Os processos de refinação aplicados ao azeite lampante e ao óleo de bagaço de azeitona bruto são muito semelhantes.

As etapas de refinação encontram-se esquematizadas na Figura 6.

Degomagem

Os fosfatídeos, proteínas e substâncias mucilaginosas que fazem parte da composição do óleo de bagaço de azeitona, são removidos nesta etapa para evitar a sua precipitação durante o período de armazenamento ou de uso. Na presença de água, a maioria destes compostos tornam-se insolúveis no óleo, podendo ser precipitados e removidos por simples hidratação (adição de água à temperatura de 60°C a 70°C). Neste tipo de degomagem os fosfatídeos absorvem a água e perdem as suas características lipofílicas, aglutinando-se e formando gomas. Estas gomas são depois separadas por centrifugação ou secas sob vácuo a temperaturas de 70°C a 80°C.

Em contraste, os fosfatídeos não hidratáveis podem ser removidos através de degomagem ácida ou enzimática. Ao óleo de bagaço de azeitona bruto adiciona-se ácido cítrico ou ácido fosfórico com o intuito de dissociar os fosfatídeos. As gomas e os ácidos fosfatídicos resultantes são removidas posteriormente por centrifugação.

Desacidificação

A desacidificação visa a eliminação dos ácidos gordos livres através da utilização de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, convertendo-os em sais de sódio solúveis em água (sabões). Esta operação ocorre a uma temperatura na gama de 65°C a 90°C.

Os sabões formados podem ser separados por centrifugação.

Descoloração

O processo de descoloração é responsável pela remoção dos pigmentos naturais presentes, de modo a que o azeite refinado se torne incolor.

Esta operação é efetuada utilizando adsorventes inertes ou com membranas; por exemplo através da adição de argila adsorvente (terra clarificante) ou de carvão ativado.

A descoloração é realizada em operações descontínuas, com uma baixa velocidade de agitação, sob vácuo, a temperaturas de 90°C a 110°C durante 20 a 30 minutos, de modo a manter em suspensão a terra clarificante que foi misturada com o óleo. A suspensão é então arrefecida a 70°C e o material clarificante é separado do óleo descolorado por filtração. Os compostos naturais coloridos tais como carotenóides e clorofilas, bem como as substâncias castanhas formadas devido ao tratamento a temperaturas elevadas durante as operações de secagem são assim removidos.

As elevadas temperaturas aplicadas durante a descoloração e na etapa subsequente (desodorização) facilitam a descoloração térmica, reduzindo assim a quantidade de terra clarificante necessária para a obtenção da cor desejável no produto acabado.

Desodorização

O objetivo da operação de desodorização é a remoção de substâncias originadas nas operações anteriores do processo de refinação que atribuem odor desagradável. Outras substâncias relativamente voláteis tais como esteróis, hidrocarbonetos ou tocoferóis são parcialmente removidas. Esta etapa visa também uma melhoria das características sensoriais e de estabilidade do produto.

Esta etapa consiste numa passagem de vapor de água, ou de outros gases inertes, através do óleo, a temperaturas elevadas e pressão reduzida, a fim de facilitar a remoção e proteger o óleo de bagaço contra a oxidação. É, portanto, um processo físico em que os vários compostos voláteis são removidos.

Após a conclusão destes processos obtém-se óleo de bagaço de azeitona refinado ou azeite refinado. Os azeites sujeitos ao processo de refinação podem ser utilizados na obtenção da categoria “azeite” ou como matéria-prima para outras indústrias alimentares.

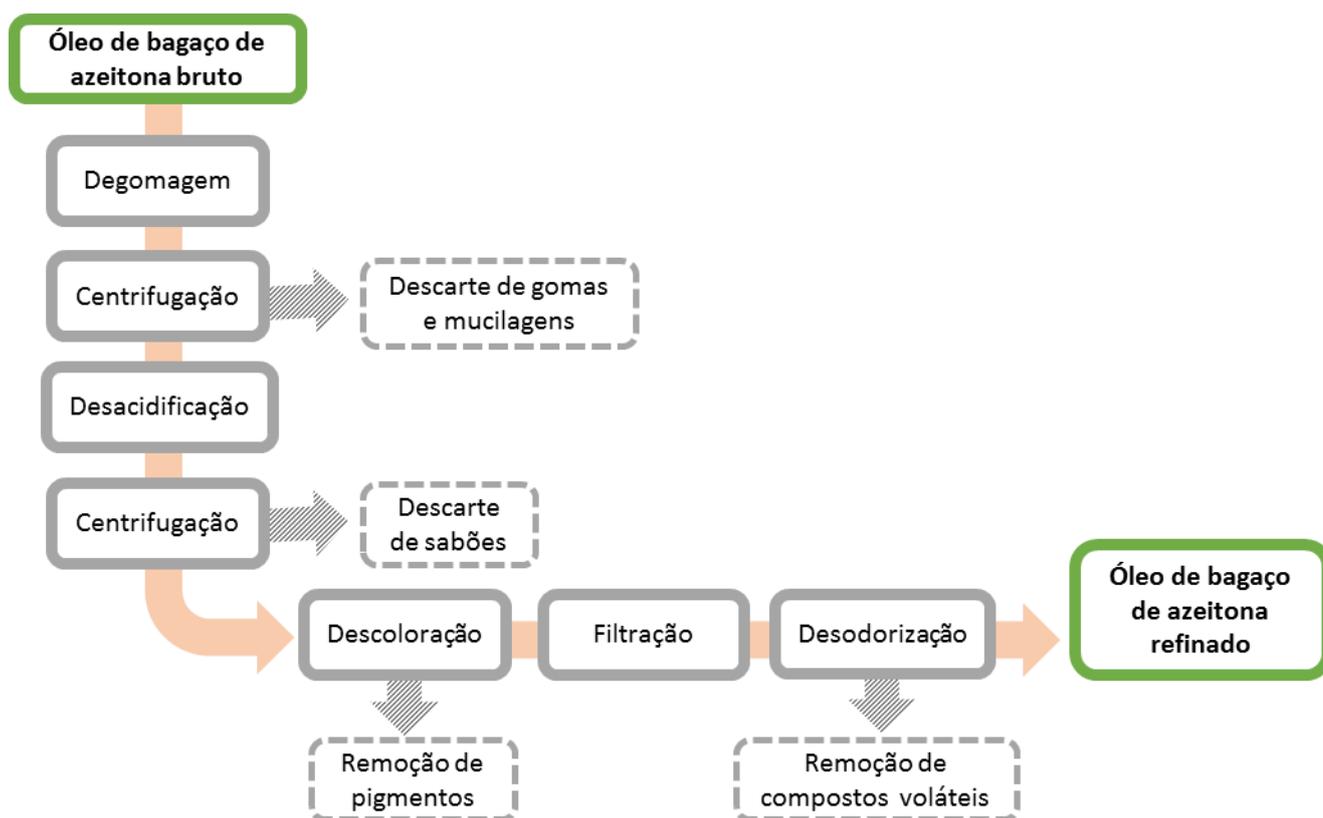


Figura 6 - Processo de refinação (adaptado de Peri, 2014)

2.1.6. VARIEDADES DE AZEITONAS

O fruto da oliveira é uma drupa verde de forma ovoide, tornando-se geralmente preta ou púrpura quando está completamente madura (Casa do Azeite, 2014). Não obstante, algumas variedades quando maduras são de cor verde ou castanho acobreado. As azeitonas contêm oleuropeína, que as torna amargas e desagradáveis, um baixo teor de açúcar (entre 2,6 a 6%) comparativamente a outras drupas (12% ou mais) e um elevado conteúdo de azeite (de 12 a 30%), dependendo da altura do ano e variedade das mesmas (Pinheiro e Silva, 2005).

As oliveiras provenientes da zona do Mediterrâneo apresentam múltiplas expressões fenotípicas, frequentemente denominadas por variedades ou cultivares (Pinheiro e Silva, 2005). Designam-se por cultivares um grupo de plantas semelhantes que tenham sido selecionadas pelas suas características de interesse, resultado de mutações e hibridações naturais (Pinheiro e Silva, 2005 e Peri, 2014).

Existem diferentes cultivares de fruto da oliveira, cada uma com características bioquímicas e morfológicas próprias. Considerando a composição varietal (mistura de um grupo definido de cultivares ou apenas uma cultivar), os azeites obtidos apresentam composições e particularidades específicas (Matos et al., 2007 e ASAE, 2014). No entanto, apesar da extensa investigação, existe falta de reprodutibilidade dos parâmetros físicos das azeitonas e das características físico-químicas do respetivo azeite (Pinheiro e Silva, 2005).

De entre as variedades de azeitonas existentes irão ser enumeradas seis, das quais uma é espanhola.

2.1.6.1. COBRANÇOSA

A cultivar Cobrançosa apresenta frutos grandes e pesados, com um bom rendimento em azeite, que tem características de frutado, acentuando-se a ervas verdes (CONFAGRI, 2009b, Barros et al., 2013 e Freitas, 2013). Esta cultivar possui um elevado conteúdo de ácido oleico e de antioxidantes, sendo por isso interessante o seu uso na produção de azeite, de modo a aumentar a atividade antioxidante e assim a estabilidade, cor e sabor (Matos et al., 2007, Garcia et al., 2012 e Sousa et al., 2014). O teor de ácidos gordos saturados é aproximadamente 14,65% (Matos et al., 2007).

2.1.6.2. CORDOVIL

De acordo com Garcia et al., 2012, esta cultivar contribui para uma baixa produção de azeite, possui um baixo conteúdo em ácido oleico mas um teor alto em ácido linoleico. O azeite extraído apresenta baixa estabilidade devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados. No entanto, o azeite tem um elevado teor de esteróis e compostos aromáticos, podendo ser utilizado concomitantemente com azeites de outras cultivares de baixo teor destes compostos a fim de aumentar o aroma do azeite produzido.

2.1.6.3. GALEGA

A variedade Galega é a mais representativa em Portugal, embora seja pouco produtiva (Instituto Nacional de Estatística, 2007). Tem como principais características o seu pequeno tamanho, um estado

de maturação precoce e uma coloração escura derivada do seu elevado conteúdo em antocianinas (Barros et al., 2013). O azeite extraído desta cultivar é doce e suave, com aromas frutados e pobre em ácido linoleico (CONFAGRI, 2009b e AFGalimentar, 2015).

2.1.6.4. MADURAL

A Madural, também designada Negral, constitui uma das variedades mais raras produzidas em solo português, embora seja uma das usadas, essencialmente no azeite de Trás-os-Montes (CONFAGRI, 2009b e AFGalimentar, 2015).

Apresenta características como um baixo teor em ácido oleico e um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados (Matos et al., 2007 e Garcia et al., 2012).

2.1.6.5. VERDEAL

A Verdeal é bastante regular e produtiva, com um bom rendimento na extração de azeite. O azeite resultante é bastante fino, de tonalidade verdosa, com um frutado marcante, e sabor bastante amargo e picante (CONFAGRI, 2009b, Garcia et al., 2012 e Freitas, 2013).

É rico em tocoferóis, polifenóis, esteróis e ácido oleico, mas pobre em ácido linoleico (Matos et al., 2007 e Garcia et al., 2012).

2.1.6.6. PICUAL

A variedade espanhola Picual tem como características sensoriais os atributos amargo (moderado) e picante (acentuado) e possui um elevado conteúdo em azeite. Os azeites extraídos possuem elevada estabilidade oxidativa, devido à sua riqueza em polifenóis e ácido oleico, bem como ao baixo teor em ácido linoleico (Beltrán et al., 2004 e Pardo et al., 2011). O colesterol está presente na proporção de aproximadamente 0,19% (Pardo et al., 2011).

2.2. BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE

Uma ingestão adequada de lípidos é de extrema importância para o ser humano devido não só ao seu contributo energético mas também pelo facto de constituírem uma fonte de ácidos gordos essenciais e de efetuarem o transporte de vitaminas lipossolúveis requeridas diariamente (Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Canciam, 2010, Dehghannejad et al., 2013, ASAE, 2014 e Gertz et al., 2014).

A dieta mediterrânica é conhecida pelos seus inúmeros benefícios para a saúde, em parte devido ao consumo de azeite, que é a principal fonte de gordura utilizada. Os efeitos benéficos do consumo de azeite virgem estão associados ao seu perfil de ácidos gordos, em particular pela riqueza em ácido oleico, bem como à presença de substâncias com propriedades antioxidantes, como os polifenóis, carotenóides, tocoferóis e esteróis que lhe conferem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas muito particulares (Bester et al., 2008, Casal et al., 2010, Silva et al., 2010, Navarra et al., 2011, Peres et al., 2011, Garcia et al., 2012, Estruch e Salas-Salvadó, 2013 e Sousa et al., 2014).

Entre as propriedades benéficas atribuídas ao consumo de azeite virgem extra rico em polifenóis, destacam-se as seguintes:

- (i) Prevenção de doenças cardiovasculares e de determinados tipos de cancro (Cardoso et al., 2010, Navarra et al., 2011, Garcia et al., 2012, Estruch e Salas-Salvadó, 2013 e Peri, 2014);
- (ii) Prevenção da peroxidação lipídica (Navarra et al., 2011, Garcia et al., 2012 e ASAE, 2014);
- (iii) Redução linear da proporção de colesterol/HDL e dos níveis de LDL oxidada (Estruch e Salas-Salvadó, 2013);
- (iv) Redução da pressão arterial (Navarra et al., 2011 e Peri, 2014);
- (v) Proteção da atividade antioxidante do α -tocoferol (Peri, 2014);
- (vi) Redução da suscetibilidade à oxidação de LDL (Navarra et al., 2011 e Garcia et al., 2012);
- (vii) Inibição da agregação plaquetária (Navarra et al., 2011 e Peri, 2014);
- (viii) Redução de níveis de colesterol no plasma (Navarra et al., 2011 e Peri, 2014).

2.3. FATORES QUE AFECTAM A QUALIDADE DO AZEITE

A qualidade do azeite produzido está relacionada, de modo geral, com a qualidade da própria matéria-prima e com as condições de laboração e utilização do produto final. As características finais podem divergir devido a mudanças em qualquer uma destas principais determinantes da qualidade do azeite.

2.3.1. FATORES AGRONÓMICOS

Existem diversos fatores que podem influenciar a qualidade do azeite virgem relacionados com a matéria-prima (cultivares utilizadas, origem geográfica, estado de maturação e acidez das azeitonas), o ambiente (condições climáticas e tipo de solo) e as práticas de cultivo (Pinheiro e Silva, 2005, Matos et al., 2007, Cardoso et al., 2010, Oliveira et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012, Gila et al., 2014 e Sousa et al., 2014). Dos fatores expostos, a cultivar e o estado de maturação são os mais importantes uma vez que durante a maturação ocorrem diversos processos metabólicos com subseqüentes implicações nos compostos minoritários, cujo perfil influencia, entre outros, a estabilidade e a capacidade antioxidante do azeite (Matos et al., 2007 e Garcia et al., 2012).

2.3.2. FATORES TECNOLÓGICOS

A composição e o perfil sensorial dos azeites virgens dependem também do tempo decorrido entre a colheita e o processamento das azeitonas, e das técnicas de extração aplicadas, designadamente das condições das operações de lavagem, moenda, termobatedura, armazenamento, e sistemas de separação e filtração. Nos azeites refinados, estes fatores aliados às condições da refinação contribuem para a qualidade do produto final (Cardoso et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012, Gila et al., 2014 e Sousa et al., 2014).

O efeito da temperatura é de extrema importância, por isso, devem ser respeitadas as temperaturas adequadas a cada etapa do processo de extração para evitar a perda de compostos essenciais bem como a degradação do azeite. Adicionalmente, fatores que influenciam o tempo de prateleira dos azeites virgens como a presença de luz devem também ser controlados (Coutelieris e Kanavouras, 2005).

2.3.3. PROCESSAMENTO TÉRMICO

O azeite pode ser consumido como tempero ou ser sujeito a processos culinários tais como a fritura, cozedura ou salteados. Nestes últimos casos, o azeite atua como meio de transferência de calor e como lubrificante para evitar que os alimentos se adiram à superfície do recipiente de culinária. Em marinadas, além de ajudar na lubrificação, o azeite melhora o sabor do alimento a ser cozinhado pela adição de elementos aromáticos (Peri, 2014).

O desempenho do azeite é influenciado, entre outros, pela presença de pró-oxidantes ou antioxidantes, o tipo de recipiente, o perfil dos ácidos gordos, e pela temperatura e duração do aquecimento (Quiles et al., 2002 e Bester et al., 2008).

As técnicas de cozinha provocam reações químicas (hidrólise, oxidação, polimerização e isomerização) resultando na perda das características organolépticas favoráveis e do valor nutricional do azeite, bem como na redução da quantidade de antioxidantes e na subsequente estabilidade (Quiles et al., 2002, Allouche et al., 2007 e Martinez-Pineda, 2011). Todas estas reações podem ser aceleradas pelo contacto com o oxigénio, humidade, contaminantes metálicos e radicais livres (Bester et al., 2008, Fernandes 2010 e Freire et al., 2013).

Relativamente às frituras convencionais (*deep frying*), o alimento é submerso em óleo ou azeite a temperaturas elevadas (aproximadamente a 180°C) com o intuito de selar o alimento para que todos os sabores permaneçam dentro da crosta crocante. Quando feito corretamente, o produto final tem uma aparência estaladiça e o alimento dentro da crosta é húmido. Este tipo de confeção é um processo complexo em que ocorrem diferentes fenómenos químicos e físicos como as reações de Maillard, hidrólise dos triacilgliceróis, oxidação dos ácidos gordos e aumento da porosidade da superfície (Kim et al., 2010 e Santos et al., 2013). Ocorrem essencialmente duas fases que consistem na desidratação parcial dos alimentos e na entrada do óleo ou azeite nos géneros alimentícios. Durante a primeira fase, a água pertencente aos alimentos e os compostos nela solubilizados são transferidos do interior dos alimentos para o exterior. Segue-se a entrada do óleo ou azeite nos alimentos através do preenchimento dos poros causados pela evaporação da água. A profundidade de penetração está condicionada pela humidade, forma e volume do alimento e, ainda, pela duração e temperatura de fritura (Sánchez-Gimeno et al., 2008, Fernandes et al., 2010, Kim et al., 2010, Martinez-Pineda, 2011, Carapinha et al., 2012 e ASAE, 2014).

A fritura pode aumentar o valor nutritivo dos alimentos devido à incorporação simultânea de componentes lipídicos importantes, nomeadamente vitaminas e ácidos gordos essenciais, desde que inseridos sob uma dieta equilibrada (Sanibal e Mancini-Filho, 2002 e Casal et al., 2010).

A qualidade dos alimentos fritos e do azeite ou óleo utilizado depende não só das condições de fritura, como a duração e temperatura de fritura ou a proporção de óleo/alimentos, mas também da natureza do óleo e do alimento utilizado. Contudo, o binómio tempo-temperatura de aquecimento é o fator preponderante no processo de fritura, já que influencia consideravelmente o nível de alteração do meio de fritura (Freire et al., 2013).

Como era de esperar, ocorrem trocas de substâncias entre os alimentos e o meio de fritura, contribuindo para a modificação da composição de ambos quer pela modificação de compostos já existentes ou pela formação de novos compostos (Martínez-Yusta e Guillén, 2014).

A presença de oxigénio e de água, provenientes da atmosfera envolvente e do próprio alimento, aliados a temperaturas elevadas, vão conduzir a várias reações químicas degradativas nomeadamente a

hidrólise, a oxidação, a isomerização e a polimerização (Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Sánchez-Gimeno et al., 2008, Casal et al., 2010, Fernandes et al., 2010, Martinez-Pineda, 2011, Carapinha et al., 2012 e Rios et al., 2013). Decorrente da hidrólise resultam ácidos gordos livres e devido à oxidação formam-se compostos instáveis (hidroperóxidos) que se decompõem rapidamente, dando origem a uma variedade de produtos secundários, de entre os quais aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos.

Dependendo da composição dos ácidos gordos, particularmente do seu grau de insaturação, e da quantidade e composição de antioxidantes, como os tocoferóis e polifenóis, cada óleo apresenta uma estabilidade oxidativa característica (Carapinha et al., 2012). Os azeites virgem extra são ricos em ácidos gordos monoinsaturados e em polifenóis, contribuindo para a sua resistência à oxidação. Estes últimos protegem os ácidos gordos dos danos oxidativos mas, o tocoferol é o primeiro antioxidante a ser consumido. Quando este desaparece, os seus produtos de oxidação tornam-se parcialmente pró-oxidantes, e assim capazes de oxidar outras moléculas, gerando-se uma reação em cadeia que culmina na ineficiência da prevenção contra a oxidação (Allouche et al., 2007, Bester et al., 2008, Navarra et al., 2011, Zorro et al., 2012, Rios et al., 2013, Santos et al., 2013 e ASAE, 2014).

A degradação térmica dos lípidos conduz também à formação de produtos de elevada massa molecular (compostos polares e triacilgliceróis poliméricos) bem como de isómeros *trans* (Bester et al., 2008, Martinez-Pineda, 2011, Carapinha et al., 2012 e Rios et al., 2013).

Neste tipo de processo a temperaturas elevadas são produzidos compostos, na sua maioria não voláteis, que permanecem no meio de fritura e conseqüentemente afetam as suas propriedades (Kalogianni et al., 2011 e Carapinha et al., 2012). Como resultado da deterioração, o óleo ou azeite sustenta algumas mudanças físicas, tais como o seu escurecimento, o aumento da viscosidade e o aparecimento de fumo e odores desagradáveis. As alterações químicas consistem na diminuição da insaturação total, no aumento do teor de ácidos gordos livres, no aparecimento de produtos de oxidação (peróxidos, hidroperóxidos, dienos conjugados, etc.) e na formação de triacilgliceróis diméricos e poliméricos (Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Sánchez-Gimeno et al., 2008, Martinez-Pineda, 2011, Zorro et al., 2012, Rios et al., 2013 e Santos et al., 2013). Estas modificações nas propriedades do azeite durante a fritura podem ser utilizadas como indicadores da degradação química dos meios de fritura. Em particular, o aumento na viscosidade durante a fritura repetida foi identificado por alguns autores como o fator responsável pelo aumento da absorção de óleo de alimentos fritos (Kalogianni et al., 2011). Do mesmo modo, a determinação do teor de compostos polares presentes nos óleos sujeitos ao processo de fritura tem sido utilizado como um parâmetro de avaliação da qualidade desses mesmos óleos (Sánchez-Gimeno et al., 2008, Ashrafi, 2012 e Carapinha et al., 2012).

A fritura requer uma grande quantidade de óleo que possa ser aquecido a uma temperatura muito alta e mantido a uma temperatura constante por um período prolongado de tempo. Para esta técnica culinária deve usar-se um óleo com elevada percentagem de ácido oleico uma vez que confere maior estabilidade e menor suscetibilidade à termoxidação. Assim, o azeite virgem extra é adequado para frituras repetidas pelo facto de ser rico em ácidos gordos monoinsaturados e ter um conjunto interessante de compostos antioxidantes na sua composição. No entanto, estes compostos antioxidantes são consumidos na proteção dos ácidos gordos (Allouche et al., 2007, Sánchez-Gimeno et al., 2008, Casal et al., 2010, Navarra et al., 2011, Ashrafi, 2012, Carapinha et al., 2012 e Santos et al., 2013). Para renovar os antioxidantes e prolongar a proteção pode considerar-se a adição de pequenas porções de azeite “fresco”. Não obstante, os compostos fenólicos do azeite virgem têm um sabor característico, atribuindo

sabor residual aos alimentos que poderá não ser bem aceite pelo consumidor. Portanto, como alternativa podem ser utilizados azeites com sabor neutro (azeites extraídos de azeitonas mais maduras ou misturas com azeite refinado, a categoria comercial designada de “azeite”) (DRAP Centro, 2002 e ASAE, 2014).

2.3.3.1. IMPACTO NA SAÚDE

Considerando que parte do azeite ou óleo utilizado nas frituras é absorvido pelo alimento, tornando-se assim parte da alimentação, o meio de fritura deve preservar a qualidade adequada no decorrer do processo.

As principais preocupações são os produtos de decomposição dos ácidos gordos, bem como a presença de possíveis contaminantes como a acrilamida. Estes compostos tóxicos (inibidores enzimáticos, produtos lipídicos oxidados, e produtos potencialmente mutagénicos) podem trazer implicações nutricionais e repercussões nefastas na saúde (Sanibal e Mancini-Filho, 2002, DRAP Centro, 2002, Sánchez-Gimeno et al., 2008, Casal et al., 2010, Kim et al., 2010, Gertz et al., 2014 e Martínez-Yusta e Guillén, 2014).

Durante a fritura, a degradação termo-oxidativa leva à formação de inúmeros isómeros *trans* dos ácidos oléico, linoleico e α -linolénico que parecem exercer efeitos negativos, por exemplo, no perfil das lipoproteínas, com implicações desfavoráveis na aterosclerose (Sanibal e Mancini-Filho, 2002 e Kim et al., 2010). Existem evidências de que a ingestão de ácidos gordos *trans* também constitui um fator de risco das doenças cardiovasculares, sendo o seu principal efeito metabólico a ação hipercolesterolémica, aumentando os níveis de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e reduzindo a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Sanibal e Mancini-Filho, 2002 e Freire et al., 2013).

Os compostos formados pela decomposição dos ácidos gordos insaturados durante o processo de fritura afetam a disponibilidade dos ácidos gordos essenciais (ácidos linoleico e α -linolénico), responsáveis pela biossíntese dos ácidos araquidónico, eicosapentanóico e docosahexanóico que servem como substrato para a formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina. Estes compostos desempenham uma ação importante nos processos da coagulação sanguínea, regulação da pressão arterial, na função imunológica e na manutenção da função e integridade das membranas celulares (Sanibal e Mancini-Filho, 2002 e Freire et al., 2013).

Assim, além dos efeitos negativos resultantes dos produtos de degradação do meio de fritura, ocorre também a diminuição dos efeitos benéficos à saúde dos ácidos gordos essenciais e a destruição de vitaminas lipossolúveis devido à auto-oxidação dos triacilgliceróis (Freire et al., 2013).

2.3.3.2. REGULAMENTO PARA DESCARTE DE ÓLEOS DE FRITURA

Durante o aquecimento do óleo ou azeite, as reações que ocorrem promovem a sua degradação e a formação de diversos compostos. As características funcionais, sensoriais e nutricionais modificam-se, sendo que quanto maior for o tempo de utilização do óleo, maior será a sua degradação (Fernandes 2010 e Zorro et al., 2012). Deste modo, passado algum tempo, não é possível continuar a produzir alimentos com qualidade. É, portanto, importante o estabelecimento de regras a observar quer na utilização de gorduras e óleos na preparação e fabrico de géneros alimentícios fritos quer o ponto de descarte destes mesmos óleos com vista a salvaguardar a saúde do consumidor. A determinação do

momento exato em que se deve descartar o óleo usado reside nos princípios de utilizar um produto já impróprio ou inutilizar um produto ainda em condições.

Existem alguns sinais da deterioração de óleos e gorduras no processo de fritura que podem auxiliar o operador, nomeadamente a alteração da cor do meio de fritura, odores desagradáveis, aumento da viscosidade, libertação contínua de fumos a temperaturas inferiores a 170°C, formação abundante de espuma e acidificação do sabor (Dobarganes e Márquez-Ruiz, 1998, DRAP Centro, 2002 e Sanibal e Mancini-Filho, 2002). No entanto, estas são alterações baseadas nas características sensoriais, influenciadas pelo operador e, por isso, constituem uma avaliação subjetiva e pouco fiável.

Neste contexto, foi criada legislação que impõe regras para a utilização dos banhos de fritura. Passando a citar a Portaria n.º 1135/95 de 15 de Setembro:

«1.º Na fritura de géneros alimentícios as gorduras e óleos comestíveis utilizados não podem apresentar um teor em compostos polares superiores a 25%;

2.º Na preparação e fabrico de géneros alimentícios sujeitos a fritura, a temperatura da gordura ou do óleo não deverá ultrapassar 180°C;

(...)

5.º Não é permitida a comercialização de géneros alimentícios fritos que tenham sido preparados ou fabricados com gorduras ou óleos comestíveis que não satisfaçam as exigências previstas no n.º 1.º;

7.º (...) são considerados impróprios para o consumo humano as gorduras e os óleos comestíveis que não satisfaçam as exigências previstas no n.º 1.º, bem como os géneros alimentícios com aqueles fabricados ou preparados.»

Devido à complexidade do processo, não existe um método único que permita detetar todas as situações que envolvem a deterioração dos óleos sujeitos a fritura. A determinação dos compostos polares, na maioria dos casos, é o método que fornece a avaliação mais segura do processo de deterioração (DRAP Centro, 2002, Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Casal et al., 2010 e Martinez-Pineda, 2011). Este parâmetro é normalmente avaliado por testes comerciais rápidos, maioritariamente baseados em métodos colorimétricos, que já provaram estar bem correlacionados com os valores obtidos por métodos oficiais, e permitem uma leitura rápida no local (Casal et al., 2010).

De um modo geral, o óleo apresenta condições adequadas até um máximo de 4 reutilizações (resultados comunicados pessoalmente pelo Dr. Jorge Justino, IPS). Contudo está dependente da natureza dos óleos ou gorduras utilizadas bem como dos géneros alimentícios fritos, do tipo de equipamento e das condições de operação (Sanibal e Mancini-Filho, 2002).

2.4. REOLOGIA

A Reologia é uma ciência que estuda a resposta dos materiais à aplicação de uma tensão ou deformação externa. É utilizada com o intuito de determinar o comportamento de soluções, suspensões e misturas, estudando a sua deformação e o fluxo de matéria (Santos et al., 2005, Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas, 2005, Fischer et al., 2009, Dehghannejad et al., 2013 e Faustino et al., 2015).

Os reogramas ou curvas de fluxo são representações gráficas utilizadas para identificar fluidos através da relação entre a tensão de corte ou de cisalhamento e a velocidade de corte ou de cisalhamento.

Esta ciência associada à indústria alimentar incide sobre as propriedades de fluxo de componentes alimentares individuais ou de matrizes alimentares e fornece uma melhor percepção das alterações estruturais resultantes do processamento dos alimentos (Fischer e Windhabl, 2011 e Ashrafi, 2012). Desta forma, o conhecimento das propriedades reológicas dos produtos alimentares permite estabelecer com maior eficácia o controlo de qualidade e melhorar a avaliação sensorial, culminando na otimização da qualidade do produto final.

O objetivo da caracterização reológica é o de quantificar as relações entre as tensões, as deformações e as propriedades reológicas resultantes como a viscosidade, a elasticidade ou a viscoelasticidade (Fischer e Windhabl, 2011). A viscosidade, obtida através do estudo reológico de alimentos líquidos e semilíquidos, constitui um parâmetro fundamental para a caracterização do fluido (Santos et al., 2005 e Dehghannejad et al., 2013).

2.4.1. VISCOSIDADE

Um fluido pode ser interpretado como matéria composta por diferentes camadas (Figura 7). Quando uma força (denominada tensão de corte ou de cisalhamento) atua sobre o fluido, as camadas de fluido deslocam-se sobre as outras. Esta força é aplicada numa direção paralela à superfície sobre a qual atua (Singh e Heldman, 2008).

De acordo com a segunda Lei de Newton, o fluido oferece uma força de resistência ao movimento, na direção oposta à tensão de cisalhamento e ao mesmo tempo numa direção paralela à superfície entre as camadas. Esta força de resistência é denominada viscosidade. A viscosidade ($\eta(\dot{\gamma})$) pode ser definida como uma medida de fricção interna de um fluido ou a sua tendência para resistir ao escoamento por ação de uma força deformadora. Consiste na relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte (Fasina et al., 2006, Canciam, 2010, Bonnet et al., 2011, Ashrafi, 2012, Gila et al., 2014 e Faustino et al., 2015).

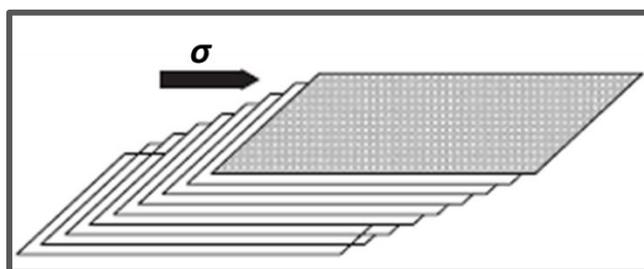


Figura 7 – Escoamento lamelar de um fluido (fonte Singh e Heldman, 2008)

A viscosidade dinâmica, ou simplesmente viscosidade, corresponde à fricção interna de um líquido ou a sua tendência para resistir ao escoamento, sendo utilizada para descrever a classe de líquidos conhecidos como fluidos newtonianos. A água é o líquido newtoniano mais conhecido. (Bourne, 2002, Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas, 2005, Fischer et al., 2009 e Faustino et al., 2015).

Por outro lado, a viscosidade aparente caracteriza um fluido não-newtoniano expresso como um fluido newtoniano. É um coeficiente calculado a partir de dados empíricos, como se o fluido obedecesse à Lei de Newton (Bourne, 2002, Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas, 2005, Fischer et al., 2009 e Faustino et al., 2015).

A medição da viscosidade dos fluidos requer a definição dos parâmetros envolvidos no escoamento, a tensão de corte e a velocidade de corte.

A tensão de corte ou de cisalhamento (σ) é a componente da tensão aplicada tangencialmente ao plano no qual a força atua, sendo expressa em unidades de força por unidade de área (Pa).

A velocidade de corte ou de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) corresponde ao gradiente de velocidade estabelecido num fluido como resultado de uma tensão de corte aplicada. Esta é expressa em unidades de tempo (s^{-1}) (Tabilo-Munizaga e Barbosa-Cánovas, 2005, Fischer et al., 2009 e Faustino et al., 2015).

Existem muitas técnicas diferentes para a determinação da viscosidade, adequadas a cada situação e material específico. Instrumentos como viscosímetros e reómetros são muitas vezes utilizados para medir a viscosidade dos óleos vegetais

Os viscosímetros baseiam-se na medida da resistência ao escoamento, num tubo capilar ou pelo torque produzido pelo movimento de um elemento através do fluido. A seleção do viscosímetro (rotacional, de capilar e de escoamento, por exemplo) depende do material e da natureza da análise pretendida.

O viscosímetro rotacional Brookfield é um dos instrumentos mais utilizados para a caracterização reológica de fluídos newtonianos e não-newtonianos. O seu funcionamento baseia-se na medição da força necessária para superar a resistência da viscosidade à rotação.

No que concerne às propriedades reológicas de óleos vegetais, os ácidos gordos desempenham um papel importante. A viscosidade destes óleos aumenta com o comprimento da cadeia de triacilgliceróis e diminui com a insaturação, ou seja, aumenta com a hidrogenação. Assim, a viscosidade está relacionada com as dimensões e orientações das moléculas (Santos et al., 2005).

De um modo geral, a viscosidade e o comportamento reológico de alimentos líquidos dependem de fatores como a temperatura, a composição e também dos tratamentos prévios que os alimentos tenham sofrido (Santos et al., 2005 e Gila et al., 2014).

2.4.2. COMPORTAMENTO REOLÓGICO

Os fluidos são classificados de acordo com seu comportamento reológico e dependem da relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte para condições de temperatura e pressão estabelecidas. Reologicamente os fluidos são divididos em duas categorias: newtonianos e não-newtonianos (Figura 8).

2.4.2.1. FLUIDOS NEWTONIANOS

Os sistemas newtonianos são caracterizados pela viscosidade constante e pela proporcionalidade direta entre a tensão de corte e a velocidade de corte, sendo a viscosidade independente da velocidade de corte dentro da gama de fluxo laminar. A viscosidade dos fluidos newtonianos pode ser descrita pela equação da Lei de Newton, correspondendo ao declive da reta definida pelo modelo linear:

$$\sigma = \eta(\dot{\gamma}) \times \dot{\gamma} \quad [1]$$

2.4.2.2. FLUIDOS NÃO-NEWTONIANOS

Muitos alimentos não se enquadram na caracterização de fluidos newtonianos uma vez que apresentam uma relação não-linear entre a tensão de corte e a velocidade de corte. Estes são

denominados fluidos não-newtonianos e podem ser classificados como dependentes ou independentes do tempo. Os independentes do tempo podem ainda ser classificados como reofluidificantes, reoessantes ou plásticos.

Os fluidos reofluidificantes (pseudoplásticos ou adelgaçantes) são caracterizados pelo decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de corte, ou seja, a tangente em cada ponto da curva de escoamento diminui com o aumento da velocidade de corte. A representação gráfica da tensão de cisalhamento em função da velocidade de corte descreve uma curva.

Os fluidos reoessantes ou dilatantes apresentam um comportamento inverso aos reofluidificantes uma vez que a viscosidade aparente aumenta com a velocidade de corte. Este comportamento é encontrado em líquidos que contêm uma elevada proporção de partículas rígidas insolúveis em suspensão.

Por sua vez, os plásticos comportam-se como sólidos sob condições estáticas necessitando que, inicialmente, uma certa tensão de corte seja aplicada para que ocorra escoamento. Uma vez atingida essa tensão, o fluido apresenta um comportamento newtoniano sendo chamado de plástico de Bingham.

Na Figura 8 estão presentes alguns tipos de fluxo em função da tensão de cisalhamento e da velocidade de corte.

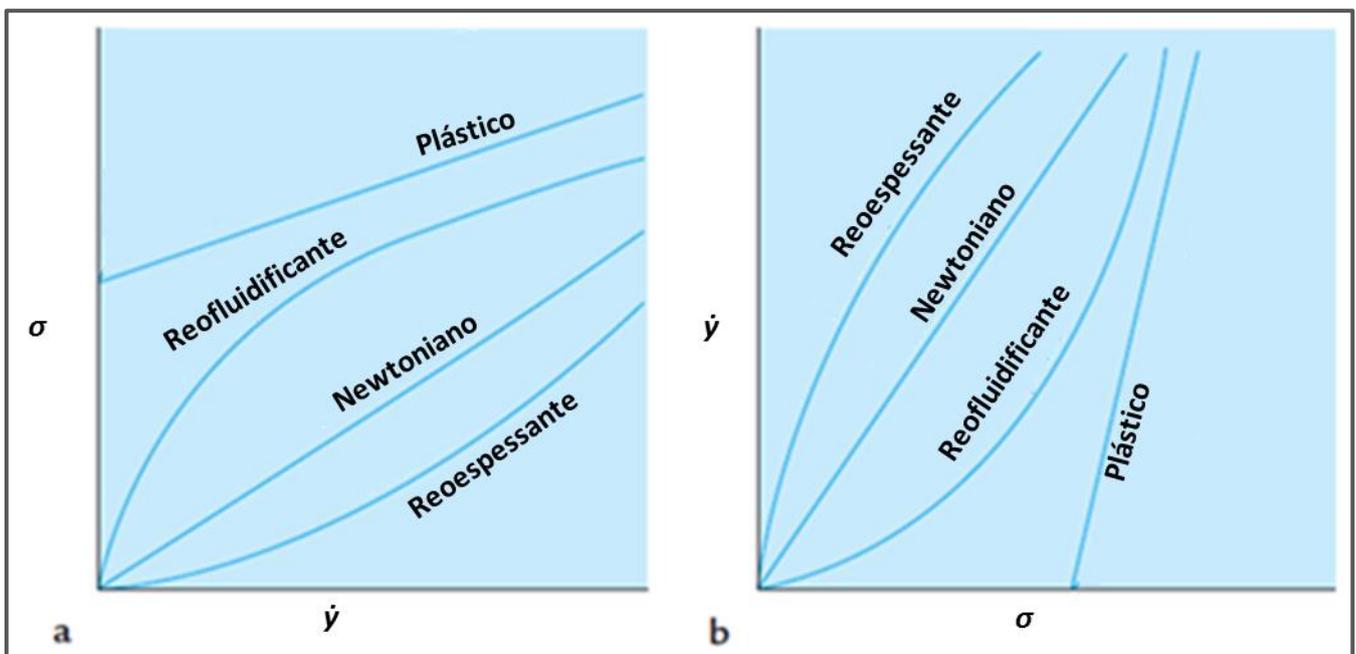


Figura 8 - Curvas de fluxo de fluidos independentes do tempo (adaptado de Bourne, 2002)

Os fluidos não-newtonianos dependentes do tempo são condicionados por uma variável adicional, o tempo. Neste tipo de comportamento observa-se uma curva de histerese.

Para que seja possível verificar se o fluido apresenta ou não viscosidade aparente dependente do tempo, realiza-se um estudo reológico onde o fluido deve ser submetido a um aumento da tensão de cisalhamento (ida). Após atingir o valor máximo, a tensão de corte deve ser reduzida até retornar ao valor inicial (volta). Se o fluido não apresenta comportamento reológico dependente do tempo, as curvas de tensão de corte em função da velocidade de corte obtidas (ida e volta) são coincidentes. Em contraste,

quando as curvas de ida e volta não são coincidentes obtém-se uma curva de histerese, remetendo para a alteração da viscosidade aparente com o tempo.

Para os fluidos não-newtonianos, existem muitos modelos reológicos propostos na literatura, sendo que a seleção do modelo a utilizar é influenciada pelas características do fluido. O modelo de Ostwald-de Waele (Lei da Potência) é dos mais estudados, devido à facilidade da sua aplicação e também porque fornece um ajuste e representação razoáveis das constantes da equação sobre o comportamento de fluxo (Giap et al., 2009). A equação 2 é a representação matemática correspondente à Lei da Potência que define o comportamento do fluido, na qual K é o índice de consistência do fluido e n é o índice de escoamento:

$$\sigma = K \times \dot{\gamma}^n \quad [2]$$

O índice de escoamento indica a proximidade da substância a um fluido newtoniano, cujo parâmetro toma valores iguais a 1. Um fluido reofluidificante apresenta valores inferiores a 1, sendo que valores superiores a 1 representam substâncias reoespessantes.

De um modo geral, os óleos vegetais são categorizados como fluidos Newtonianos uma vez que a viscosidade se mantém inalterada independentemente da velocidade de corte (Santos et al., 2005 e Ashrafi, 2012).

2.4.3. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A VISCOSIDADE

A temperatura é um dos fatores que pode influenciar o comportamento reológico de um fluido. A análise ao efeito da temperatura sobre a viscosidade é essencial na avaliação de materiais que vão ser sujeitos a variações de temperatura durante sua utilização ou processamento.

Existem diversas expressões matemáticas que relacionam a viscosidade com a temperatura. O modelo mais simples é a equação de Arrhenius que demonstra a dependência da temperatura, isto é, descreve a diminuição exponencial da viscosidade com o aumento da temperatura (Canciam, 2010, Kim et al., 2010 e Bonnet et al., 2011). Utilizando este modelo é possível calcular a energia de ativação com base no declive da reta definida pela expressão:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_0 \exp\left(\frac{Ea}{R \times T}\right) \text{ ou } \ln \eta(\dot{\gamma}) = \frac{Ea}{R} \frac{1}{T} + \ln \eta_0 \quad [3]$$

onde,

$\eta(\dot{\gamma})$ = viscosidade da amostra, expressa em Pa.s;

Ea = energia de ativação, em J/mol;

$R = 8.314$ J/mol.K, corresponde à constante universal dos gases;

T = temperatura absoluta, expressa em K;

η_0 = fator pré-exponencial, expresso sob a forma de Pa.s.

A energia de ativação de fluxo é um parâmetro que pode ser relacionado com a suscetibilidade térmica, ou seja, reflete a sensibilidade de uma substância às variações de temperatura. Assim, as substâncias que apresentam valores de energia de ativação de fluxo mais baixos são consideradas menos suscetíveis às variações de temperatura (Canciam, 2010 e Kim et al., 2010).

As equações mais utilizadas no cálculo da viscosidade de fluidos baseiam-se na Teoria do Estado de Transição (Canciam, 2010). Esta teoria caracteriza os fluidos como um conjunto de moléculas, em constante movimento, intercaladas por posições desocupadas (vacâncias) que se movem com o objetivo de ocuparem as vacâncias adjacentes. Para se deslocarem, as moléculas têm de ultrapassar as barreiras da energia de ativação criadas pela resistência das unidades circundantes. A viscosidade está relacionada com o atrito existente entre as moléculas durante o movimento, sendo uma medida de fricção interna do fluido. Assim, quanto maior a viscosidade, maior será a barreira potencial que uma molécula terá que vencer para ocupar o espaço livre adjacente ou seja, maior a energia de ativação.

2.4.4. APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA

Na indústria alimentar, o conhecimento das propriedades reológicas dos fluidos é essencial para diversas aplicações que incluem o *design* de processos tecnológicos, nomeadamente para desenvolvimento e ajuste de equipamentos (bombas e tubagens, agitadores, refrigeradores, homogeneizadores, etc), o controlo de qualidade do produto, tanto nas etapas intermediárias de fabrico como no produto final, e o desenvolvimento de novos produtos (Abramovic e Klofutar, 1998, Brock et al., 2008 e Canciam, 2010).

A viscosidade é um dos parâmetros fundamentais nas etapas de processamento de alimentos, uma vez que influencia o escoamento de alimentos fluidos, a agitação e mistura, com implicações no *design* dos equipamentos e nas características do produto final. Como exemplo, é muito importante conhecer e controlar esta propriedade na formulação e preparação de emulsões, cremes, géis, polpas, entre outros (Canciam, 2010). Torna-se portanto interessante o estudo reológico do azeite uma vez que é uma ferramenta importante no desenvolvimento, instalação e adaptação dos parâmetros aos equipamentos de controlo de qualidade.

Aliado à viscosidade, o efeito da temperatura sobre os parâmetros reológicos tem muita importância na tecnologia alimentar, em particular nos óleos (Dehghannejad et al., 2013 e Gila et al., 2014). A viscosidade dos azeites é uma consideração importante no *design*, tamanho e seleção de equipamento adequado (bombas, sistemas de filtração ou decantação, equipamentos de centrifugação, etc.), bem como em diversas etapas do processo de extração. Como exemplo, na etapa de filtração são removidas partículas suspensas no azeite, sendo que o seu tamanho e a sua diferença de densidade comparativamente ao azeite constituem fatores importantes para a taxa de filtração. A viscosidade dinâmica do azeite também influencia a taxa de filtração, sendo a última inversamente proporcional à viscosidade do azeite. Assim, o conhecimento preciso da viscosidade possibilita a otimização do tempo dispensado nesta etapa (Fasina et al., 2006, Bonnet et al., 2011 e Gila et al., 2014).

O conhecimento das propriedades reológicas associadas a cada alimento permite avaliar possíveis transformações que possam ter ocorrido. Ou seja, as alterações nas propriedades reológicas são também atribuídas às alterações físico-químicas nos óleos. A mudança da viscosidade pode assim ser indicativa de possível degradação (Ashrafi, 2012).

Em suma, a viscosidade e a sua variação com a temperatura são parâmetros muito sensíveis uma vez que afetam as etapas e os equipamentos de extração do azeite, bem como a qualidade do produto final.

2.5. PARÂMETROS ANALÍTICOS

A determinação das características dos azeites permite inferir sobre a sua classificação bem como a sua qualidade e possíveis adulterações. Assim, as análises físico-químicas efetuadas aos azeites permitem identificar duas situações seguintes:

- (i) Verificação da categoria declarada (critérios de qualidade), que depende essencialmente da qualidade da matéria-prima e do processo de extração;
- (ii) Verificação da identidade (critérios de pureza), em que se verifica a ocorrência de adulterações, tais como o uso de aditivos proibidos ou adjuvantes tecnológicos, a mistura de azeite virgem com azeites refinados ou outros óleos vegetais e a utilização de processos tecnológicos não autorizados.

Esta caracterização é efetuada através do conhecimento de diversos parâmetros. Os mais comuns são a determinação dos índices de acidez, iodo, saponificação, peróxidos, Bellier e refração bem como a determinação da densidade relativa, a absorção específica a 232 nm e 270 nm, a composição em esteróis, entre outros.

2.5.1. DENSIDADE RELATIVA

A densidade é uma propriedade importante que influencia a transferência de calor por convecção e o movimento flutuante de bolhas de gás num líquido (por exemplo, bolhas de vapor no óleo) (Kalogianni et al., 2011). Esta propriedade físico-química varia com a natureza do óleo e é sensível à temperatura, verificando-se que a densidade do óleo diminui linearmente com o aumento de temperatura (Gila et al., 2014).

2.5.2. ÍNDICE DE ACIDEZ

O parâmetro da acidez do azeite está relacionado com a natureza e qualidade da matéria-prima, com o processamento e conservação, bem como a decomposição dos componentes lipídicos (Fernandes et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012 e PerkinElmer, 2012). A desagregação dos triacilgliceróis, por hidrólise, lipólise ou oxidação, é evidenciada pela formação de glicerol e de ácidos gordos livres. Todavia, a acidez não tem relação direta com o sabor do azeite, visto que os produtos da reação são insípidos e inodoros não acarretando, portanto, defeitos sensoriais. (Casa do Azeite, 2014 e Peri, 2014).

O aumento considerável da acidez do azeite indicia a sua alteração pela formação de ácidos gordos livres de cadeia longa, bem como de ácidos orgânicos de cadeia curta, aldeídos e cetonas que resultam do processo de oxidação. Este facto pode dever-se a condições de laboração inapropriadas ou deficiente acondicionamento da matéria-prima bem como do produto final (Dias, 2009, Oliveira et al., 2010 e Rios et al., 2013).

2.5.3. ÍNDICE DE BELLIER

O índice de Bellier é utilizado na verificação de possíveis adulterações e do grau de pureza do azeite. Um índice elevado denota uma mistura de azeite com outros óleos vegetais, nomeadamente óleo de amendoim (Mello e Pinheiro, 2012).

2.5.4. ÍNDICE DE IODO

O grau de insaturação do azeite é determinado pelo índice de iodo, sendo este dependente das ligações duplas que reagem com os compostos de iodo. Assim, a um elevado índice de iodo corresponde um maior número de ligações duplas e, conseqüentemente, a um maior grau de insaturação dos ácidos gordos presentes na gordura.

Uma vez que o intervalo dos valores referentes ao índice de iodo é característico de cada gordura, a sua determinação permite identificar adulterações provocadas pela mistura de diferentes óleos vegetais (Sanibal e Mancini-Filho, 2002 e Cardoso et al., 2010).

2.5.5. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

A oxidação envolve a formação de peróxidos, que afetam a estabilidade do produto, promovendo a rancidez hidrolítica. A presença de peróxidos deve-se a fatores tais como as elevadas temperaturas e a exposição a oxigénio por períodos prolongados, entre outros (Zorro et al., 2012 e Gertz et al., 2014).

A determinação do índice de peróxidos é útil para monitorizar a deterioração oxidativa, sendo esta influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos gordos e pela quantidade de antioxidantes presentes (Casal et al., 2010 e Mello e Pinheiro, 2012). Quanto maior for o número de ligações insaturadas nos ácidos gordos, maior é a suscetibilidade do azeite a reações de oxidação (Mello e Pinheiro, 2012 e Rios et al., 2013).

Valores altos deste índice são indicativos da degradação do azeite, devido possivelmente a questões relacionadas com a manipulação inadequada da azeitona ou deficiente preservação do azeite (PerkinElmer, 2012).

Os antioxidantes presentes no azeite reagem com os radicais livres resultantes do processo oxidativo. Supostamente, o índice de peróxidos aumenta apenas quando os antioxidantes existentes são insuficientes para compensar a formação desses radicais, ou seja, no estado inicial existe um equilíbrio entre a taxa de formação de peróxidos e a sua taxa de degradação (Bester et al., 2008 e Martinez-Pineda, 2011).

2.5.6. ÍNDICE DE REFRAÇÃO

A refratometria é uma técnica analítica utilizada para a determinação da composição de misturas binárias, bem como para a obtenção de informações relativas ao grau de pureza de um composto, através da medição do índice de refração.

O índice de refração é característico de cada tipo de óleo e está relacionado com o grau de insaturação e com o tamanho da cadeia de ácidos gordos. No entanto, é dependente de fatores como o

teor de ácidos gordos livres, os compostos de oxidação e o tratamento térmico. Em geral, o índice de refração diminui com o aumento da temperatura (Hui, 2006 e Rios et al., 2013).

O elevado valor do índice de refração indica a presença de um grande número de ligações duplas e, conseqüentemente, um elevado grau de insaturação. Adicionalmente pode também indiciar a presença de impurezas (Martins et al., 2010 e Mello e Pinheiro, 2012). Do mesmo modo torna-se útil não só para identificar a substância, mas também para detetar a presença de impurezas (Martins et al., 2010).

Este índice define-se como a relação entre o seno do ângulo de incidência de um raio luminoso no ar, de comprimento de onda conhecido (normalmente risca D do sódio – 589,3 nm), e o seno do ângulo de refração do raio refractado no azeite, neste caso. (Farmacopeia Portuguesa VII, 2002 e FSSAI, 2012).

2.5.7. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

Este índice depende da natureza dos ácidos gordos que constituem a gordura ou o óleo. Indica a quantidade relativa de ácidos gordos de alto e baixo peso molecular obtidos após a saponificação, sendo inversamente proporcional ao peso molecular dos ácidos gordos presentes e ao comprimento da sua cadeia. Deste modo, os ácidos gordos de maior peso molecular, que por sua vez possuem cadeias longas, libertam um menor número de ácidos gordos por grama de gordura hidrolisada e, por conseguinte, apresentam um índice de saponificação mais baixo (Mello e Pinheiro, 2012).

O índice de saponificação reflete o comprimento das cadeias de ácidos gordos.

2.5.8. COEFICIENTES DE EXTINÇÃO

A análise espectrofotométrica na região ultravioleta pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda, o seu estado de conservação e as modificações devidas aos processos tecnológicos a que foi sujeita. Avalia também o estado de oxidação do azeite (Casal et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012 e Santos et al., 2013).

As absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda especificados no método (232 e 270 nm) são devidas à presença de sistemas diénicos e triénicos conjugados, respetivamente (Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo IX). Estes compostos formam-se devido à oxidação e/ou refinação do óleo. Assim, os azeites virgens provenientes de matérias-primas de boa qualidade bem como de práticas corretas de produção e condições adequadas de armazenagem, contêm poucos produtos de oxidação, facto evidenciado por valores de K_{232} e K_{270} inferiores ao máximo preconizado na legislação (Codex Alimentarius, 2001 e Peri, 2014).

No que concerne aos azeites refinados, durante o processo de refinação as ligações duplas presentes nos ácidos gordos polinsaturados alteram a sua posição e formam compostos dienóicos e trienóicos conjugados. Estes últimos absorvem a aproximadamente 270 nm. Isto significa que os óleos refinados têm valores maiores de extinção a 270 nm (Codex Alimentarius, 2001 e Mello e Pinheiro, 2012). Desta forma, os coeficientes de extinção permitem inferir sobre a mistura de azeite virgem com óleos refinados (PerkinElmer, 2012 e Peri, 2014).

Face ao exposto, um coeficiente de extinção elevado pode ser considerado como um indicador da oxidação ou da adulteração do azeite.

É de referir que a extinção específica consiste essencialmente na medição do estado de alteração do azeite e não na medição do processo de refinação.

2.5.9. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A avaliação da fração fenólica e a sua composição fornece informações importantes sobre a qualidade, estabilidade e valor nutricional do azeite (Mello e Pinheiro, 2012). O método mais fidedigno baseia-se na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que se caracteriza pela sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, o potencial antioxidante também pode ser avaliado por métodos químicos ou enzimáticos, mas estes são complexos e de processo demorado (Mosca et al., 2000).

O ensaio colorimétrico de Folin – Ciocalteu para a determinação do teor de fenóis totais é um método bastante utilizado pela sua simplicidade. A maior desvantagem do método colorimétrico é a sua baixa especificidade, uma vez que deteta todos os grupos fenólicos presentes nos extratos. Adicionalmente, este método fornece apenas informação quantitativa, não indicando a natureza dos compostos fenólicos presentes (Capannesi et al., 2000, Mosca et al., 2000, Tasioula-Margari e Okogeri, 2001 e Hrnčirik e Fritsche, 2004).

3.1. AMOSTRAS

As amostras utilizadas no estudo desenvolvido consistem em azeite de quinta, proveniente de um lagar situado na região da Guarda, bem como azeites virgem extra DOP's provenientes de diferentes regiões do país, nomeadamente de Moura, Norte Alentejo, Trás-os-Montes e Ribatejo.

O azeite virgem extra DOP de Moura (Azeite M) utilizado é constituído por azeitonas de variedade Cordovil, Galega e Verdeal (Figura 9). O processo de extração reportado é exclusivamente mecânico e a frio, não comportando quaisquer outras operações para além da lavagem, da moenda, do batimento, da centrifugação e da filtragem (informações retiradas do site oficial).

O azeite virgem extra DOP Norte Alentejano (Azeite A) escolhido é monovarietal visto que são apenas utilizadas azeitonas da variedade Galega para a produção do azeite (Figura 9). A extração no ponto alto de maturação da matéria-prima origina aromas e sabores fortes (informações retiradas do site oficial).

A elaboração do azeite virgem extra DOP de Trás-os-Montes (Azeite T) selecionado para este trabalho é feita utilizando como matéria-prima azeitonas de variedades Verdeal, Madural e Cobrançosa (Figura 9) (informações retiradas do site oficial).

Relativamente ao azeite virgem extra DOP do Ribatejo (Azeite R), a sua obtenção é feita a partir das variedades de azeitonas Galega e Cobrançosa (Figura 9), sendo usado o processo de extração a frio (informações retiradas do site oficial).

Por último, o azeite de quinta utilizado (Azeite B), que provém da região da Guarda, tem como matéria-prima azeitonas das variedades Cobrançosa e Picual referentes à colheita do ano 2014 (Figura 9). Não são aplicados critérios rigorosos de seleção da matéria-prima para obter este azeite, utilizando-se uma mistura das azeitonas colhidas em diversos estados de maturação. Este azeite não está sujeito a controlo de qualidade aquando do seu fabrico.

As amostras foram adquiridas num supermercado local, com exceção do azeite de quinta que nos foi facultado pelo produtor. Foram armazenadas nos próprios recipientes num local escuro à temperatura ambiente.

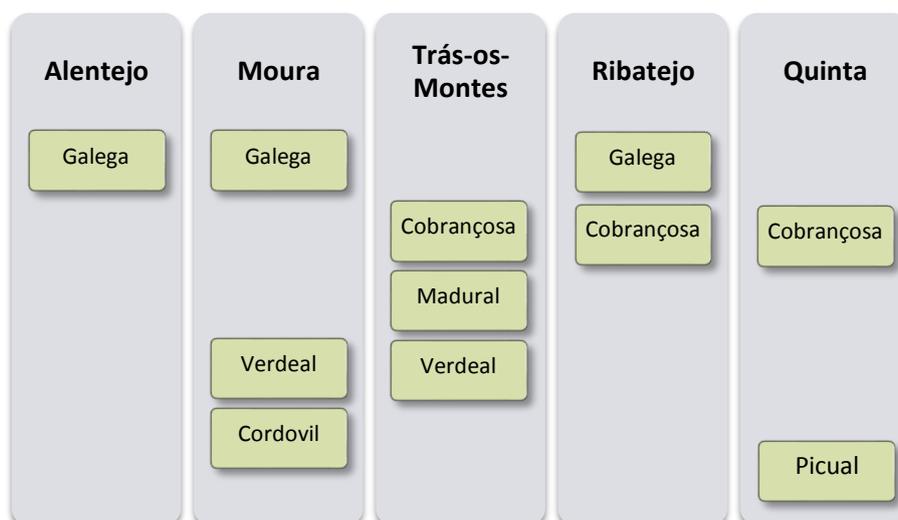


Figura 9 - Variedades de azeitonas das amostras de azeites virgem extra em estudo

3.1.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1.1. ENSAIO REOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO

Para o ensaio reológico relativo à determinação da energia de ativação de fluxo foram apenas selecionados os azeites virgem extra DOP's. Estes foram retirados diretamente da garrafa sem sofrerem qualquer tratamento térmico.

De forma sucinta, neste ensaio as amostras foram colocadas num reator de vidro, ligado a um banho termostático com circulação, onde se determinou a viscosidade para as diversas temperaturas em estudo (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C).

3.1.1.2. OUTROS ENSAIOS

Uma vez que se pretende determinar o efeito da temperatura no comportamento reológico bem como em outras propriedades físico-químicas dos azeites, as amostras foram submetidas a diferentes processamentos térmicos e comparadas com amostras controlo, as quais não sofreram aquecimento. Assim, como ilustrado na Figura 10, as amostras foram agrupadas em três categorias: (i) sem processamento térmico (20°C), (ii) sujeitas a processamento térmico moderado (60 e 100°C) e (iii) sujeitas a ciclos de fritura (180°C).

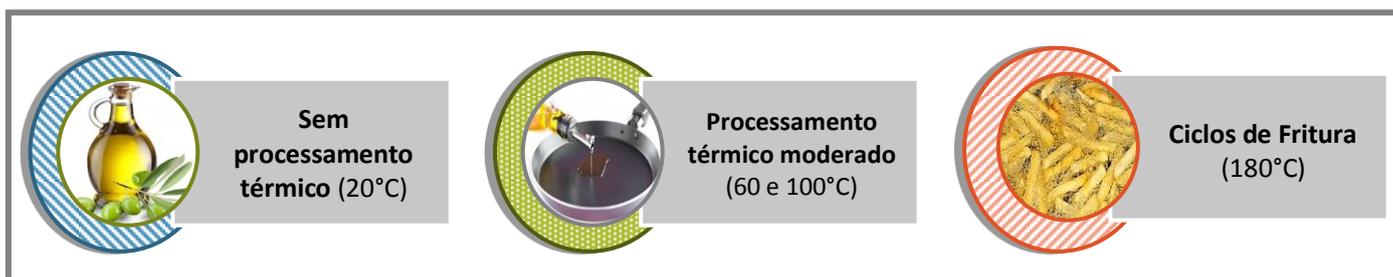


Figura 10 - Tratamento das amostras

O processamento térmico foi efetuado por um período de 30 minutos pretendendo-se simular as temperaturas obtidas em diferentes condições de confeção culinária. Como referido anteriormente, as condições aplicadas na confeção não são inteiramente simuladas visto que não se consideram as transferências de substâncias do alimento para o azeite, nem as propriedades interfaciais entre o azeite e os alimentos, entre outros (Kalogianni et al., 2011). As amostras foram submetidas a temperaturas distintas ($60 \pm 10^\circ\text{C}$; $100 \pm 5^\circ\text{C}$) através do seu aquecimento num copo de precipitação sobre uma placa de aquecimento de forma a manter o azeite na gama de temperatura pretendida durante 30 minutos. O controlo da temperatura foi monitorizado com o auxílio de um termómetro digital.

Relativamente ao processo de fritura, submetem-se as amostras dos azeites a temperaturas elevadas ($180 \pm 10^\circ\text{C}$), num igual período de tempo (30 minutos), utilizando um recipiente de alumínio com controlo de temperatura interno. Adicionalmente pretendeu-se avaliar as condições das amostras a processamentos mais agressivos, submetendo-as a três ciclos de fritura. Assim, as amostras foram aquecidas até $180 \pm 10^\circ\text{C}$, arrefecidas naturalmente até à temperatura ambiente, e novamente aquecidas

a $180 \pm 10^\circ\text{C}$, completando os três ciclos. A temperatura foi verificada com o auxílio de um termómetro digital.

Após o processamento térmico, todas as amostras foram arrefecidas naturalmente com a finalidade de as analisar à temperatura ambiente ($20 \pm 3^\circ\text{C}$).

A preparação das amostras ocorreu no mesmo dia da sua análise, não sendo armazenadas após tratamento térmico com a finalidade de evitar fatores interferentes, nomeadamente as condições e tempo de armazenamento.

3.1.1.3. EQUIPAMENTO PARA O PROCESSAMENTO TÉRMICO DAS AMOSTRAS

- Placa de aquecimento, marca Framo –Gerätetechnik, modelo M24/1;
- Fritadeira elétrica de utilização doméstica;
- Termómetro digital Durac.

3.2. MATERIAIS E METODOLOGIAS

3.2.1. ANÁLISE REOLÓGICA

Com a análise reológica pretendeu-se determinar a viscosidade das amostras em estudo e consequentemente avaliar o seu comportamento reológico (através da variação da viscosidade com a velocidade de corte), bem como inferir sobre o efeito da temperatura nas propriedades de fluxo estudadas.

O efeito da temperatura foi estudado em dois ensaios distintos: (i) determinação da energia de ativação para o processo de fluxo; (ii) avaliação da viscosidade após diferentes processamentos térmicos.

3.2.1.1. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A VISCOSIDADE - ENERGIA DE ATIVAÇÃO

Material

- Copos de precipitação de forma alta, de 200 e 600 mL;
- Reator de vidro, de 600 mL (para aquecimento com banho termostático).

Equipamento

- Banho de ultrassons, (JPSelecta, modelo 513);
- Banho termostático, (Julabo, modelo F10/UC, precisão de $0,1^\circ\text{C}$, intervalo de medição de -20°C a $+100^\circ\text{C}$);
- Termómetro digital, (Durac, com precisão de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ para uma gama de temperaturas de -20 a 70°C e $\pm 1^\circ\text{C}$ para uma gama de temperaturas de 70 a 120°C);
- Viscosímetro digital, (Brookfield, modelo LV DV-II+, precisão de velocidades de corte entre $0,1$ a 200 rpm);
- Agulhas Brookfield, LV 1, SC16-4.

Procedimento experimental

Antes da utilização do viscosímetro digital Brookfield na determinação das viscosidades dos azeites em estudo, procedeu-se à sua calibração por utilização do fluido calibrante polidimetilsiloxano (PDMS) com o auxílio da agulha LV1.

No início de cada experiência, o viscosímetro foi nivelado por verificação da bolha de ar situada no topo do equipamento (Figura 11). Posteriormente selecionaram-se os parâmetros (i) tempo de cisalhamento e (ii) velocidades rotacionais. Como referido na secção 3.1.1.1, as viscosidades lidas são referentes a seis temperaturas, no intervalo de 20 a 70°C, sendo obtidas após decorridos 60 segundos de cisalhamento para cada uma das velocidades rotacionais selecionadas. Estas situaram-se no intervalo entre 15 a 80 rpm, sendo escolhida a agulha mais adequada com base na viscosidade do fluido em estudo. Para cada experiência, de modo a evitar a formação de bolhas de ar, introduziram-se 200 mL de amostra num copo de precipitação (volume suficiente para cobrir a agulha Brookfield imersa, até ao meio da indentação). Nos ensaios de viscosidade seguintes o copo de precipitação foi colocado num banho de ultrassons para eliminar eventuais bolhas de ar que tivessem sido formadas.

O copo foi colocado num reator de vidro acoplado a um banho termostático com circulação para manter a temperatura de trabalho constante, bem como assegurar a precisão da mesma.

Seguidamente adaptou-se a agulha LV-1 ao viscosímetro, procedendo-se à sua imersão na amostra de forma cuidada de forma a prevenir a formação de bolhas de ar e mantê-la centrada no copo de precipitação. Ajustou-se o recipiente que continha a amostra para que a agulha permanecesse centrada, sem entrar em contacto com o copo.

Selecionada a temperatura de trabalho para cada análise, as leituras no viscosímetro foram efetuadas 15 minutos após se alcançar o equilíbrio térmico pretendido, na gama de velocidades rotacionais pretendidas. Registaram-se os valores da viscosidade, expressos em mPa.s, para cada temperatura de trabalho e velocidade rotacional.

Para cada amostra efetuaram-se medições em triplicado, aplicando de forma alternada velocidades rotacionais crescentes e decrescentes.



Figura 11 - Montagem para o ensaio da energia de ativação de fluxo

3.2.1.2. AVALIAÇÃO REOLÓGICA

O comportamento reológico é determinado pela análise das curvas de fluxo da tensão de corte ou viscosidade em função da velocidade de corte. Estes parâmetros são obtidos a partir dos valores de viscosidade obtidos no viscosímetro digital.

Material

- Copos de precipitação de forma alta, de 200 e 600 mL;

Equipamento

- Banho de ultrassons, (JPSelecta, modelo 513);
- Termómetro digital, (Durac, com precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para uma gama de temperaturas de -20 a 70°C e $\pm 1^{\circ}\text{C}$ para uma gama de temperaturas de 70 a 120°C);
- Viscosímetro digital, (Brookfield, modelo LV DV-II+, precisão de velocidades de corte entre $0,1$ a 200 rpm);
- Agulhas Brookfield, LV 1, SC16-4.

Procedimento experimental

Estes ensaios foram realizados utilizando o procedimento referido na secção 3.2.1.1., excetuando as seguintes alterações: as leituras da viscosidade foram efetuadas à temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo obtidas após decorridos 60 segundos de cisalhamento para cada uma das velocidades rotacionais selecionadas, situadas no intervalo de 6 a 90 rpm (Figura 12).

Para cada amostra efetuaram-se medições em triplicado, aplicando de forma alternada velocidades rotacionais crescentes e decrescentes, com o objetivo de inferir também sobre o efeito do tempo no comportamento reológico.



Figura 12 - Montagem para a determinação da viscosidade

3.2.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

No decorrer dos ensaios físico-químicos as soluções necessárias à sua realização foram preparadas conforme métodos indicados em Farmacopeias.

As determinações dos respetivos ensaios foram efetuadas em triplicado para cada temperatura selecionada.

3.2.2.1. DENSIDADE RELATIVA

A densidade relativa define-se como a razão entre a densidade da substância em estudo e a densidade de um material de referência, em condições de temperatura e pressão definidas. É expressa sob a forma de d_{20}^{20} substância/água a 20°C - d_{20}^{20} (Codex Alimentarius, 2001).

Material

- Copos de precipitação;
- Picnómetro de 25 mL.

Equipamento

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g);
- Termómetro digital, (Durac, com precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para uma gama de temperaturas de -20 a 70°C).

Procedimento Experimental

A densidade foi determinada pelo método do picnómetro, utilizando como valores tabelados os existentes na norma IUPAC 2.101:1992. A água destilada foi utilizada como líquido de referência para a determinação do volume do picnómetro e, conseqüentemente, da densidade das amostras.

Pesou-se o picnómetro com a tampa numa balança analítica e registou-se o valor – m_0 . De seguida, encheu-se o picnómetro com água destilada de modo a cobrir completamente o capilar do interior da tampa. Este passo foi efetuado cuidadosamente para prevenir a formação de bolhas de ar. O picnómetro foi novamente pesado – m_2 .

Registou-se também a temperatura de trabalho – t_2 – com o auxílio de um termómetro digital e consultou-se a densidade da água – $\rho_{\text{H}_2\text{O}.t_2}$ – tabelada à temperatura considerada (Tabela 2).

O picnómetro foi depois lavado com etanol, colocado numa estufa para remover possíveis resíduos de etanol e deixado a arrefecer. Posteriormente lavou-se o picnómetro com uma pequena porção da amostra a utilizar, encheu-se com essa amostra e registou-se o seu peso – m_3 .

Este procedimento foi repetido para todas as amostras, sendo utilizado o mesmo picnómetro.

Tabela 2 - Valores tabelados para a densidade da água (fonte IUPAC 2.101:1992)

Temperature t_2 (°C)	Density of water ρ_{H_2O, t_2} (g/ml)	Temperature t_2 (°C)	Density of water ρ_{H_2O, t_2} (g/ml)	Temperature t_2 (°C)	Density of water ρ_{H_2O, t_2} (g/ml)
15	0.99805	35	0.99298	55	0.98465
16	0.99789	36	0.99264	56	0.98416
17	0.99772	37	0.99228	57	0.98367
18	0.99754	38	0.99192	58	0.98317
19	0.99735	39	0.99155	59	0.98267
20	0.99715	40	0.99117	60	0.98217
21	0.99694	41	0.99079	61	0.98165
22	0.99672	42	0.99039	62	0.98113
23	0.99649	43	0.98999	63	0.98060
24	0.99624	44	0.98958	64	0.98006
25	0.99599	45	0.98917	65	0.97952
26	0.99573	46	0.98874		
27	0.99546	47	0.98832		
28	0.99518	48	0.98788		
29	0.99490	49	0.98744		
30	0.99460	50	0.98699		
31	0.99429	51	0.98654		
32	0.99398	52	0.98607		
33	0.99365	53	0.98561		
34	0.99332	54	0.98513		

A densidade foi determinada através da relação entre a massa medida e o volume do picnómetro utilizado. O volume do picnómetro corrigido para a temperatura de 20°C – V_t – obteve-se pela aplicação da fórmula presente na norma IUPAC 2.101:1992:

$$V_t = \frac{m_2 - m_0}{\rho_{H_2O, t_2}} [1 + 0,000025 (t - t_2)] \quad [4]$$

onde,

m_2 = massa, em g, do picnómetro com água;

m_0 = massa, em g, do picnómetro vazio;

ρ_{H_2O, t_2} = densidade da água à temperatura considerada, em g/mL;

t_2 = temperatura considerada na realização do ensaio, em °C;

t = temperatura final de 20°C;

0,000025 = coeficiente de expansão térmica do vidro.

A densidade foi determinada não levando em consideração a força da impulsão.

A massa da amostra resultou da subtração da massa do picnómetro com a amostra pela massa do picnómetro vazio:

$$m_{\text{amostra}} = m_3 - m_0 \quad [5]$$

em que,

m_3 = massa, em g, do picnómetro com amostra;

m_0 = massa, em g, do picnómetro vazio.

Assim, é possível obter a densidade da amostra de azeite virgem extra, em g/mL, para uma temperatura de 20°C:

$$\rho_{20^{\circ}\text{C}} = \frac{m_{\text{amostra}}}{V_t} \quad [6]$$

De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, a densidade deve ser apresentada sob a forma de d_{20}^{20} . Desta forma, a densidade corresponde à relação entre a densidade da amostra a 20°C e a densidade da água à mesma temperatura. (Farmacopeia portuguesa VII, 2002).

3.2.2.2. ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Os resultados obtidos variam de acordo com a temperatura e o comprimento de onda utilizados (FSSAI, 2012, Farmacopeia Portuguesa VII, 2002).

O índice de refração é determinado a 20°C e referido à risca D do sódio - n_D^{20} (Codex Alimentarius, 2001).

Material

- Algodão hidrófilo;
- Copo de precipitação;
- Pipeta de Pasteur.

Equipamento

- Refratómetro de Abbe, (Bellingham & Stanley, modelo 60/ED, precisão $\pm 0,00006$ (20 °C) ao comprimento de onda de 589 nm).

Procedimento experimental

O procedimento aplicado está em conformidade com FSSAI, 2012 e Bellingham & Stanley, 2013.

Precedente à determinação do índice de refração das amostras a analisar, o equipamento foi calibrado com água destilada.

Foi ligada uma luz externa com o intuito de facilitar a visualização da escala-padrão do refratómetro de Abbe e conseqüentemente obter uma leitura o mais distinta possível. Colocaram-se duas gotas da amostra, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sobre o centro do prisma fixo (prisma de iluminação) após a sua limpeza. O prisma móvel (prisma de refração) foi fechado e registou-se a temperatura ambiente (Figura 13). O excesso de amostra que eventualmente saiu foi limpo para a obtenção de uma fronteira mais nítida. Primeiramente ajustou-se o campo visual, posicionando a fronteira de modo a que a interface iluminada-escuro coincidissem com o ponto de cruzamento das linhas (Figura 14). De seguida efetuou-se a leitura na escala, indicando o índice de refração da amostra para a temperatura de trabalho (Figura 15). Foram efetuadas três leituras, sendo o resultado final resultante da média.

Entre a colocação das diversas amostras os prismas foram limpos com água destilada e etanol e depois secos com algodão hidrófilo.

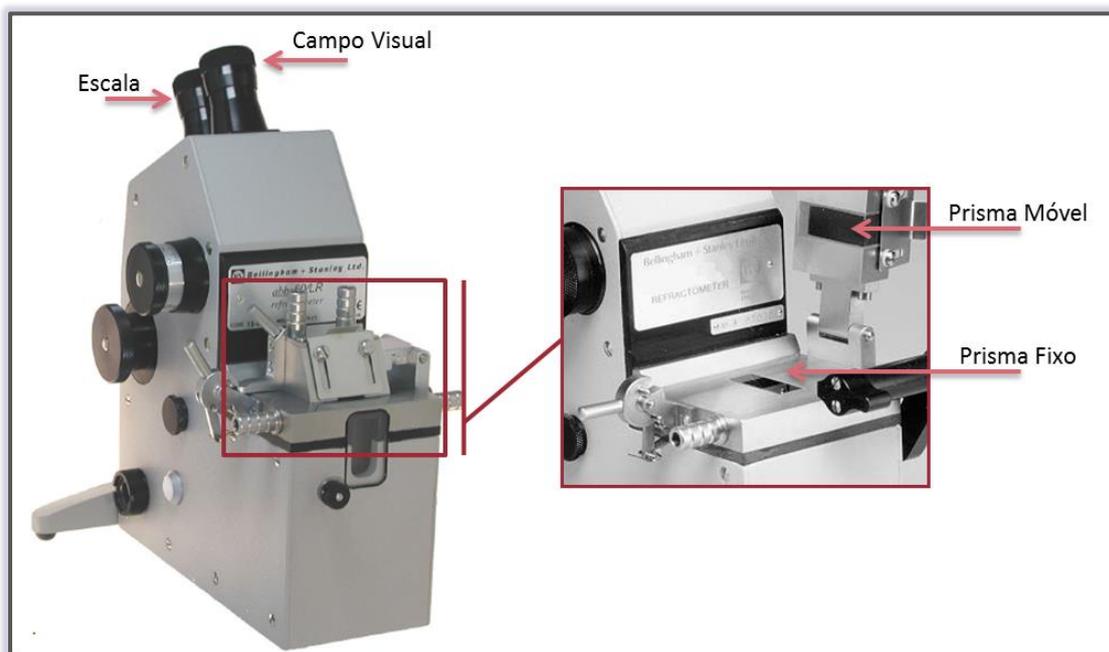


Figura 13 - Refratômetro de Abbe (fonte Bellingham & Stanley, 2013)

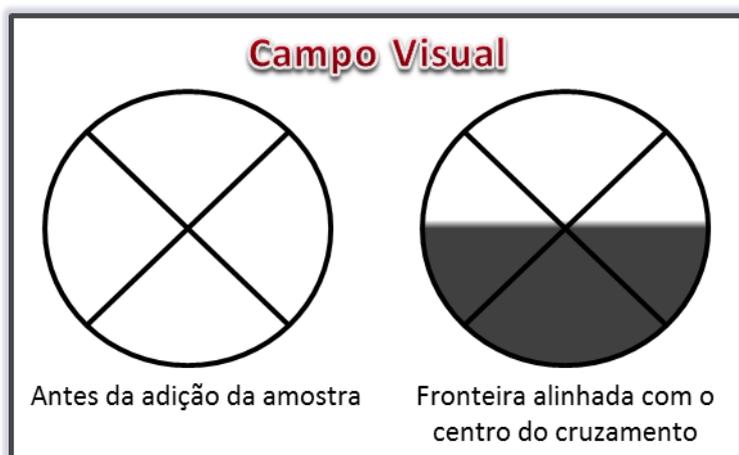


Figura 14 - Campo visual do refratômetro de Abbe (adaptado de Bellingham & Stanley, 2013)

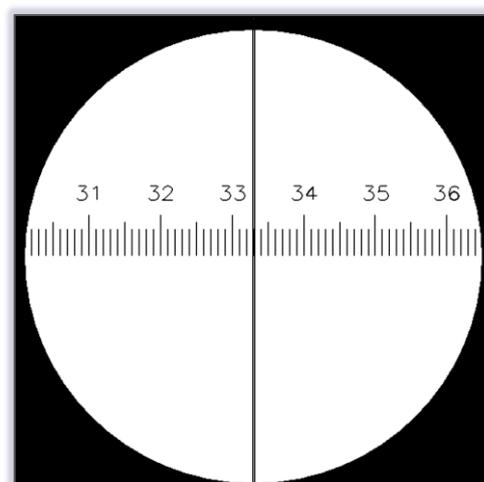


Figura 15 - Escala de um refratômetro de Abbe (fonte Bellingham & Stanley, 2013)

O cálculo da correção da temperatura foi feito através de:

$$n_D^{20} = n_D^{t_2} + k \times (t_2 - t) \quad [7]$$

onde,

n_D^{20} = índice de refração corrigido à temperatura padrão;

$n_D^{t_2}$ = índice de refração referente à leitura com a temperatura t_2 ;

k = constante empírica, 0,0003885 para óleos;

t = temperatura padrão expressa em °C, neste caso 20 °C;

t_2 = temperatura da leitura efetuada, expressa em °C.

3.2.2.3. ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez pode ser definido como a quantidade de hidróxido de potássio (KOH) necessária para neutralizar os ácidos gordos livres presentes em 1 g de amostra. Representa assim a quantidade de ácidos gordos livres (Codex Alimentarius, 2001).

É expresso sob a forma de percentagem de massa de ácidos gordos livres em relação a um ácido gordo específico, nomeadamente o ácido oleico (M = 282,46 g/mol). Assim, o índice de acidez apresenta-se como % (m/m) de ácido oleico (Codex Alimentarius, 2001, ISO 660:1996/Amd.1:2003).

A determinação do teor em ácidos gordos livres foi realizada através de uma volumetria ácido-base com solução KOH como titulante e solução de fenolftaleína como indicador, permitindo o acompanhamento da reação de rancificação.

Material

- Balão volumétrico de 1000 mL;
- Bureta de 50 mL;
- Copo de precipitação;
- Erlenmeyer de 150 mL com tampa;
- Pipeta de Pasteur;
- Proveta de 25, 50 e 100 mL.

Reagentes

- Solução de éter-álcool (2:1) neutra: Éter Dietílico, (Sigma-Aldrich, CAS: 60-29-7); Etanol Absoluto, (Merck, CAS: 64-17-5);
- Solução alcoólica de fenolftaleína, solução de 1 g em 100mL de etanol a 95% (V/V);
- Solução de hidróxido de potássio a 0,1 M: Hidróxido de Potássio, (Ceamed, CAS: 1310-58-3).

Equipamento

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g).

Procedimento experimental

O índice de acidez foi determinado de acordo com a norma ISO 660:1996/Amd.1:2003 e com a metodologia descrita por Fernandes et al., 2010. Consultou-se também o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo II), posteriormente alterado pelo Regulamento (CE) n.º 702/2007 da Comissão, de 21 de Junho.

Pesaram-se 2 g de amostra num Erlenmeyer de 150 mL, ao qual foram adicionados 25 mL de solução de éter-álcool (2:1). Após agitação foram adicionadas duas gotas da solução de fenolftaleína como indicador da titulação. Procedeu-se à titulação com solução 0,1 mol/L de hidróxido de potássio (KOH), até

se verificar o aparecimento de uma coloração rósea ou ligeira cor de tijolo, a qual deveria persistir por 30 segundos (Figura 16). Registou-se o volume de KOH utilizado para cada amostra. Realizou-se concomitantemente um ensaio em branco.

Uma vez que se verificou que este índice estava sujeito a alterações após a abertura das garrafas, a sua determinação foi efetuada para todas as temperaturas selecionadas aquando da abertura das mesmas.

O cálculo do índice de acidez foi efetuado segundo o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo II), posteriormente alterado pelo Regulamento (CE) n.º 702/2007 da Comissão, de 21 de Junho:

$$IA \% (m/m) = \frac{V \times c \times M}{10 \times m_a} \quad [8]$$

onde,

V = volume, em mL, de hidróxido de potássio consumido na titulação;

c = concentração, em mol/L, da solução de hidróxido de potássio;

M = massa molar, em g/mol, do ácido oleico;

m_a = massa, expressa em g, correspondente à amostra.

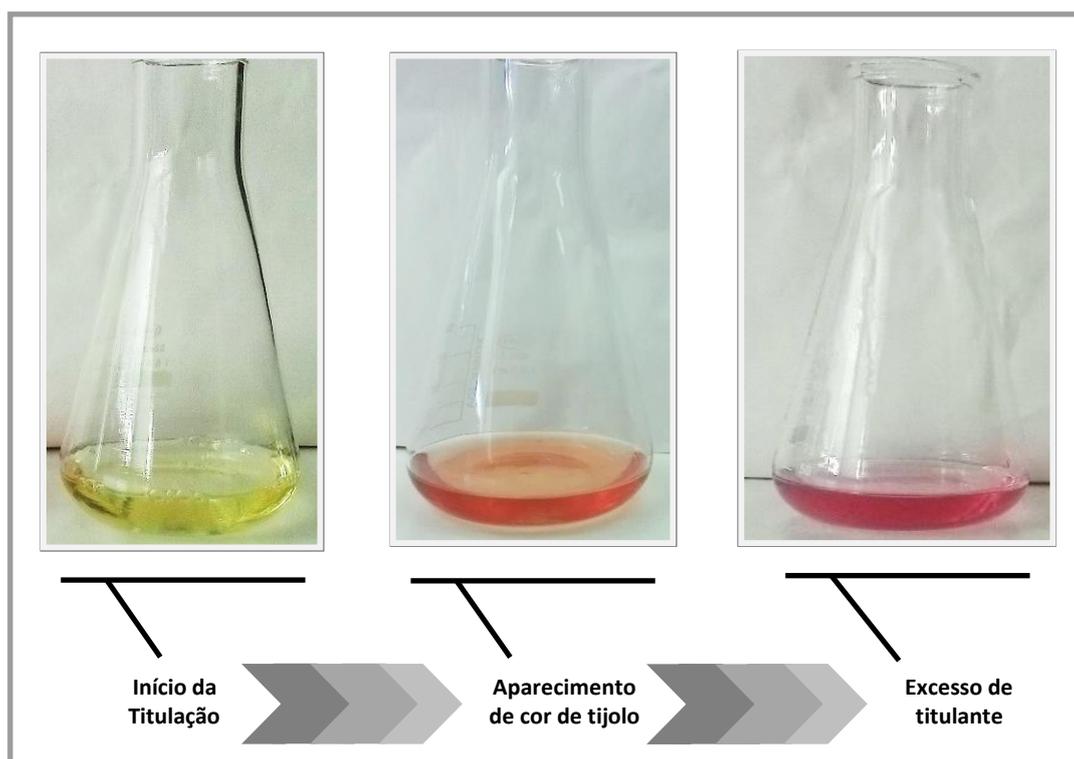


Figura 16 - Titulação efetuada na determinação do índice de acidez

3.2.2.4. ÍNDICE DE BELLIER

Este índice consiste na temperatura à qual ocorre precipitação dos sais dos ácidos gordos quando o azeite é saponificado e neutralizado. Isto é, o índice de Bellier corresponde à temperatura (°C) à qual se observa turvação, que é específica para cada óleo (Codex Alimentarius, 2001, Mello e Pinheiro, 2012, FSSAI, 2012).

Material

- Condensador de Liebig;
- Copo de precipitação;
- Erlenmeyer de 150 mL com tampa;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta graduadas de 2 e 5 mL;
- Proveta de 50 e 100 mL;
- Tina.

Reagentes

- Ácido acético 25% (V/V): Ácido Acético Glacial, (Chemlab, CAS: 64-19-7);
- Álcool etílico 70% (V/V): Etanol Absoluto, (Merck, CAS: 64-17-5);
- Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 8% (m/V): Etanol Absoluto, (Merck, CAS: 64-17-5); Hidróxido de Potássio, (Ceamed, CAS: 1310-58-3).

Equipamentos

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g);
- Placa de aquecimento, (Framo –Gerätetechnik, modelo M24/1);
- Termómetro digital, (Durac, com precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para uma gama de temperaturas de -20 a 70°C).

Procedimento experimental

A determinação deste índice foi baseada nos procedimentos descritos no Codex Alimentarius, 2001. Complementarmente consultaram-se as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985.

Num Erlenmeyer de 150 mL colocaram-se 0,8 g de amostra com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, seguindo-se a adição de 5 mL de solução alcoólica de KOH a 8%. Foi inserido um magnete dentro do Erlenmeyer, ao qual se adaptou um condensador de Liebig para se proceder ao seu aquecimento sobre uma placa. A saponificação considerou-se completa após 10 minutos.

A amostra foi arrefecida com água corrente até atingir uma temperatura de $25 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, sendo depois adicionados 50 mL de álcool etílico a 70% e 1,5 mL de ácido acético a 25%. Após a homogeneização, comprovou-se a temperatura ($26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) com um termómetro digital.

Posteriormente arrefeceu-se lentamente a solução uma vez que a temperatura deveria baixar aproximadamente 1°C por minuto. A solução foi então mergulhada numa tina com água (colocada sobre gelo), sendo retirada 5 segundos depois, e agitada brevemente. Este processo foi repetido até se verificar a turvação da amostra (Figura 17).

Registou-se como índice de Bellier a temperatura à qual se observou turvação.

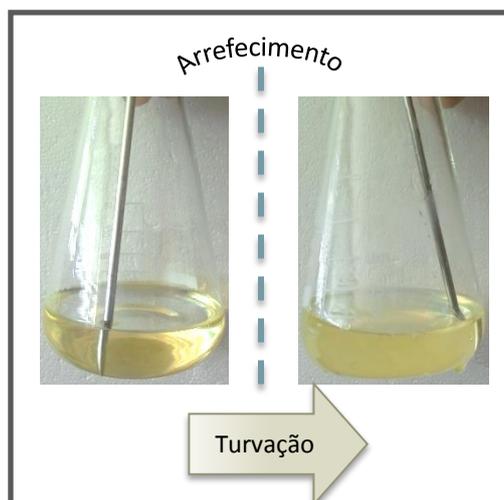
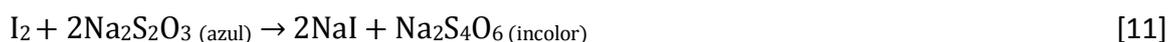


Figura 17 - Aparecimento de turvação no índice de Bellier

3.2.2.5. ÍNDICE DE IODO

O índice de iodo quantifica o grau de insaturação dos ácidos gordos da amostra, sendo expresso em % (*m/m*) de iodo absorvido (Codex Alimentarius, 2001 e Mello e Pinheiro, 2012).

O processo consiste em dissolver a amostra num solvente, seguido da adição de reagente de Wijs (solução de monocloreto de iodo em ácido acético glacial) que reage com os ácidos gordos insaturados (equação 9). Esta reação decorreu num ambiente escuro visto que a luz catalisa a ligação parcial do iodo às duplas ligações dos ácidos gordos. Após um determinado intervalo de tempo, adicionou-se iodeto de potássio (KI) para converter o monocloreto de iodo remanescente que não reagiu ($\text{ICl}_{\text{remanescente}}$) em iodo (equação 10). Procedeu-se à titulação do iodo formado com uma solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (equação 11).



Material

- Balão volumétrico de 50, 100 e 1000 mL;
- Bureta de 50 mL;
- Copo de precipitação;
- Erlenmeyer de 150 e 500 mL;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta graduada de 1 e 10 mL;
- Pipeta volumétrica de 25 mL;
- Proveta de 25, 50 e 100 mL.

Reagentes

- Reagente de Wijs (solução de monocloreto de iodo em ácido acético glacial): Solução Wijis, (Merck, CAS: 7790-99-0);

- Solução de amido como indicador a 1% (m/V): Amido solúvel, (Merck, CAS: 9005-84-9);
- Solução de iodeto de potássio a 15% (m/V): Iodeto de potássio, (Sigma-Aldrich, CAS: 7681-11-0);
- Solução de tiosulfato de sódio a 0,1 M: Tiosulfato de sódio pentahidratado, (Merck, CAS: 10102-17-7);
- Solvente - mistura de ciclohexano e ácido acético (1:1): Ciclohexano, (Sigma-Aldrich, CAS:110-82-7); Ácido Acético Glacial, (Chemlab, CAS: 64-19-7).

Equipamento

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g).

Procedimento experimental

Foram aplicados os procedimentos descritos no Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo XVI), bem como na Farmacopeia Portuguesa VII, 2002 e na norma AOCS (1995).

Num Erlenmeyer de 500 mL colocaram-se aproximadamente 0,25 g da amostra e 10 mL de solvente, cuja composição consistiu em ciclohexano e ácido acético. Com auxílio de uma pipeta volumétrica adicionaram-se 25 mL da solução de Wijs, seguido de homogeneização. O recipiente que continha a amostra foi envolto em folha de alumínio e colocado num local escuro à temperatura ambiente durante 1 hora.

Após repouso, foram adicionados 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% (m/V) e 100 mL de água desionizada, recentemente fervida e arrefecida. Procedeu-se à titulação com tiosulfato de sódio a 0,1 M até a coloração castanha, devida à presença de iodo, ter suavizado – Titulação 1 (Figura 18). Registou-se o volume consumido.

Posteriormente adicionou-se 1 mL de solução indicadora de amido 1% (m/V) originando uma solução de coloração azul-escura. Titulou-se novamente com tiosulfato de sódio, obtendo-se uma solução final incolor – Titulação 2 (Figura 18). Registou-se o volume de titulante utilizado. Assim, o volume gasto em ambas as titulações corresponde ao volume consumido de tiosulfato de sódio.

Foi efetuado paralelamente um ensaio em branco.

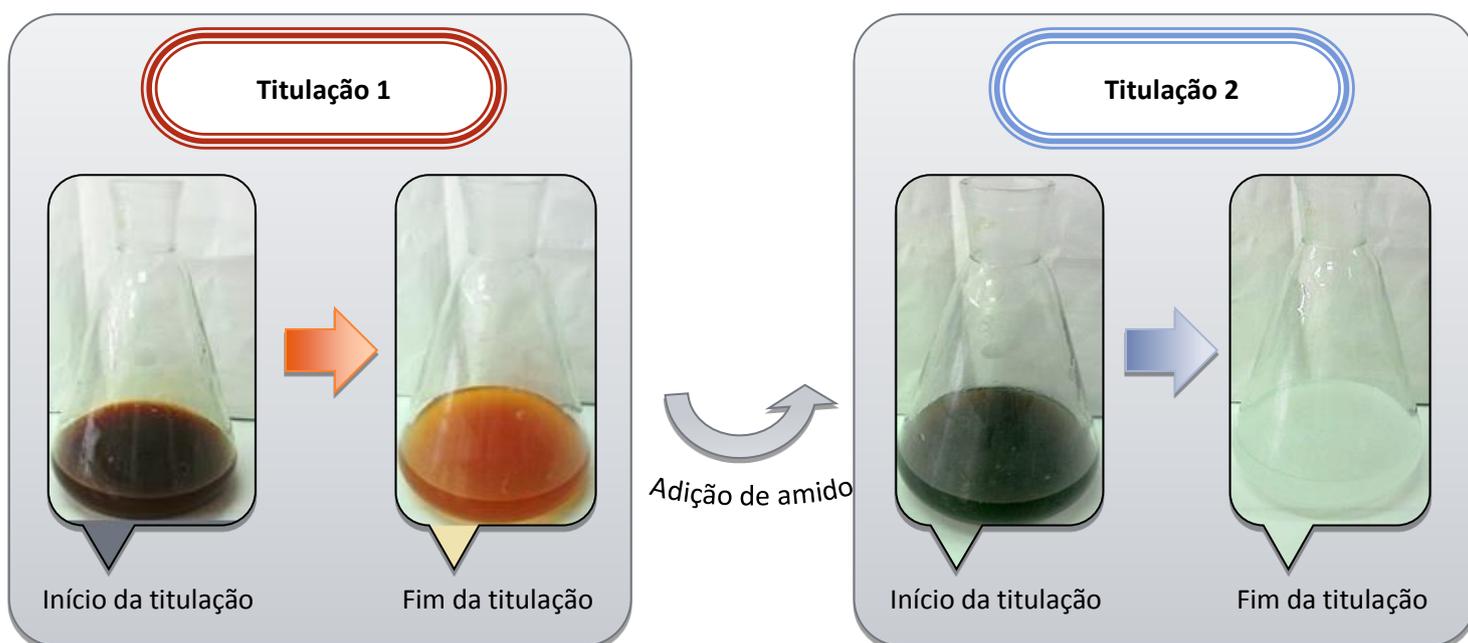


Figura 18 - Titulação efetuada para a determinação do índice de iodo

Para determinar este índice foi aplicada a equação descrita no Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo XVI):

$$II \% (m/m) = \frac{12,69 \times c \times (V_b - V_a)}{m_a} \quad [12]$$

onde,

c = concentração, em mol/L, da solução de tiosulfato de sódio;

V_b = volume, em mL, de tiosulfato de sódio consumido na titulação do ensaio em branco;

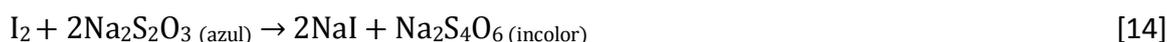
V_a = volume, em mL, de tiosulfato de sódio utilizado na determinação da amostra;

m_a = massa, expressa em g, correspondente à toma da amostra.

3.2.2.6. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O método baseia-se na determinação de substâncias capazes de oxidar o iodeto de potássio em meio ácido dando origem a iodo. Estas substâncias provenientes do processo de oxidação dos ácidos gordos são consideradas como sendo peróxidos ou produtos semelhantes, nomeadamente hidroperóxidos, que podem ser determinados por iodometria (Mello e Pinheiro, 2012, ISO 3960:2007, Pokorny et al., 2001). A iodometria aplicada resulta da reação do grupo hidroperóxido (ROOH) com iodeto de potássio (KI) (equação 13). A quantidade de iodo (I_2) libertado é proporcional à concentração de peróxidos presentes na amostra. Este iodo é determinado por titulação com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), utilizando amido como indicador (equação 14). Assim, um elevado índice de peróxidos pode estar relacionado com o aumento da formação de hidroperóxidos (Pokorny et al., 2001).

Os resultados são expressos em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de amostra - mEq O_2 /kg (Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro (Anexo I)).



Material

- Balão volumétrico de 50 e 1000 mL;
- Bureta de 50 mL;
- Copo de precipitação;
- Erlenmeyer de 25 e 150 mL com tampa;
- Micropipeta de 1000 μ L
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta graduada de 1 mL;
- Proveta de 25 e 100 mL.

Reagentes

- Ácido acético glacial: Ácido Acético Glacial, (Chemlab, CAS: 64-19-7);
- Clorofórmio: Clorofórmio, (Fisher-Chemical, CAS: 67-66-3);

- Solução de amido como indicador a 1% (m/V): Amido solúvel, (Merck, CAS: 9005-84-9);
- Solução aquosa saturada de iodeto de potássio: Iodeto de potássio, (Sigma-Aldrich, CAS: 7681-11-0);
- Solução de tiosulfato de sódio a 0,01 M: Tiosulfato de sódio pentahidratado, (Merck, CAS: 10102-17-7).

Equipamento

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g).

Procedimento experimental

Consultou-se o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo III) bem como a Farmacopeia Portuguesa VII, 2002, para a determinação deste índice.

A toma de amostra considerada depende do valor de peróxidos esperado. Na Tabela 3 estão representadas as tomas de amostras correspondentes a cada processamento térmico aplicado.

No matraz de Erlenmeyer que continha a amostra adicionaram-se 10 mL de clorofórmio e 15 mL de ácido acético glacial, procedendo-se à sua dissolução por agitação. De seguida adicionou-se 1 mL de solução de iodeto de potássio, novamente seguido por agitação. O Erlenmeyer foi coberto com papel de alumínio e colocado na ausência de luz, à temperatura ambiente, por um período de 5 minutos. Após este intervalo de tempo, adicionaram-se 75 mL de água destilada bem como 0.5 mL da solução de amido, obtendo-se uma solução com coloração escura a azulada.

Procedeu-se à titulação com tiosulfato de sódio a 0,01 M até se verificar o desaparecimento da cor e registou-se o volume utilizado para a determinação de peróxidos (Figura 19).

Foi efetuado simultaneamente um ensaio em branco.

Tabela 3 - Tomas das amostras para o índice de peróxidos (adaptado de Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho)

t (°C)	m _{amostra} (g)	IP (mEq O ₂ / kg)
20	1,3 – 1,4	≤ 20
60	1,3 – 1,4	≤ 20
100	1,3 – 1,4	≤ 20
180	ciclo 1	1,1 – 1,2
	ciclo 2	0,8
	ciclo 3	0,5

Os valores do índice de peróxidos foram calculados segundo a equação:

$$IP = \frac{(V_a - V_b) \times c \times 1000}{m_a} \quad [15]$$

em que,

V_a = volume, em mL, de tiosulfato de sódio utilizado na determinação da amostra;

V_b = volume, em mL, de tiosulfato de sódio consumido na titulação do ensaio em branco;

c = concentração, em mol/L, da solução de tiosulfato de sódio;
 m_a = massa, expressa em g, correspondente à toma da amostra.

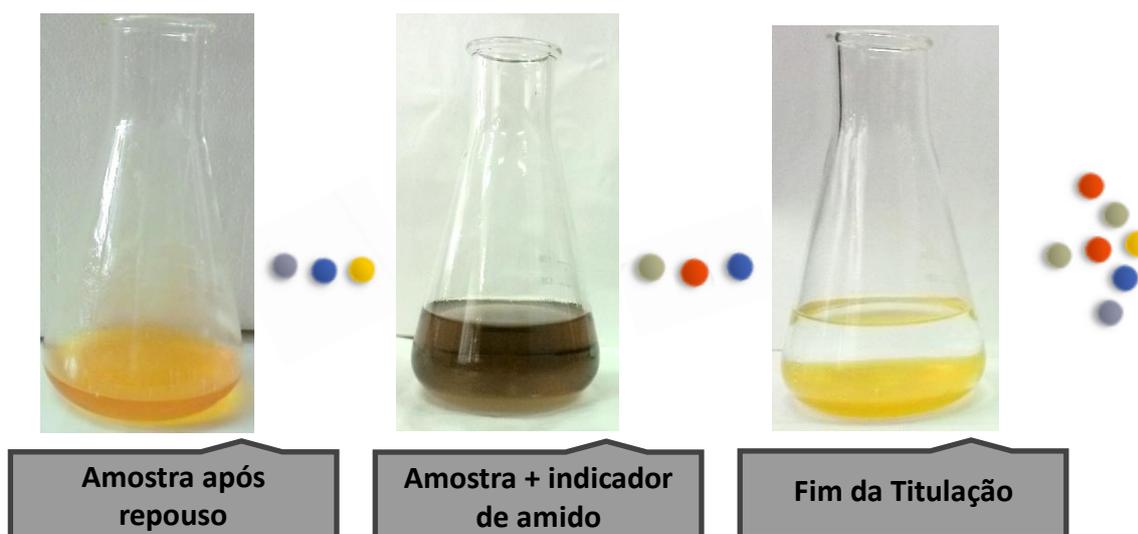
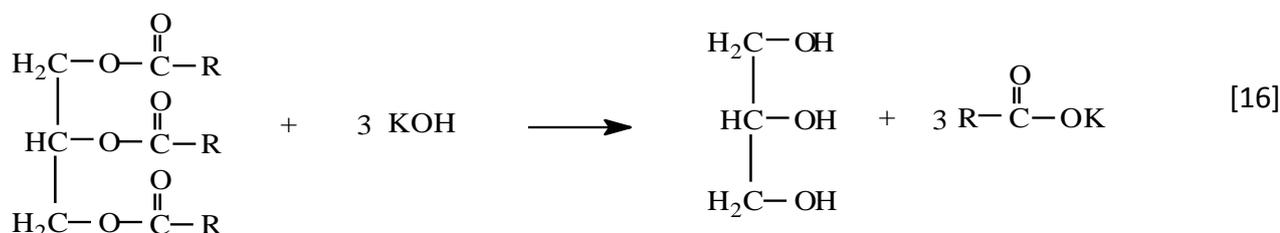


Figura 19 - Coloração obtida no índice de peróxidos

3.2.2.7. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, o índice de saponificação expressa a quantidade de hidróxido de potássio necessário para saponificar 1 g de óleo, neste caso de azeite (mg KOH/g óleo).

No aquecimento de óleos com a utilização de soluções alcalinas, os triacilgliceróis (ésteres de ácidos gordos) são hidrolisados formando glicerol e sais alcalinos de ácidos gordos livres (sabão). Este processo denomina-se saponificação (equação 16).



Material

- Bureta de 50 mL;
- Condensador de Liebig;
- Copo de precipitação;
- Matraz de Erlenmeyer de 150 mL com tampa;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta volumétrica de 25 mL;
- Proveta de 25 e 100 mL.

Reagentes

- Solução alcoólica de fenolftaleína, solução de 1g em 100mL de etanol a 95% (V/V);

- Solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4% (*m/V*): Hidróxido de Potássio, (Ceamed, CAS: 1310-58-3;
- Solução de ácido clorídrico a 0,5 M: Ácido Hidroclorídrico, (Carlo Erba, CAS:7647-01-0).

Equipamentos

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g).
- Placa de aquecimento, (Framo –Gerätetechnik, modelo M24/1).

Procedimento experimental

A determinação do índice de saponificação foi realizada segundo os métodos apresentados em United States Pharmacopeia, 2013.

Colocaram-se 2 g da amostra num Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 25 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4 % (*m/V*). Foi adaptado ao Erlenmeyer um condensador de Liebig, sendo o conjunto colocado sobre uma placa de aquecimento. Com o intuito de saponificar a amostra, esta foi aquecida durante 1 hora após se verificar o refluxo.

Dependendo da amostra, a coloração obtida permaneceu semelhante ou mais escura, entre amarelo e laranja, respetivamente (Figuras 20 e 21). A parte interna do condensador foi lavada com 10 mL de água destilada, adicionando-se de seguida 4 gotas da solução de fenolftaleína.

A titulação foi efetuada a quente com uma solução de ácido clorídrico a 0,5 M até se verificar o desaparecimento da coloração rósea (Figuras 20 e 21). Registou-se o volume gasto de titulante.

Foi efetuado simultaneamente um ensaio em branco.

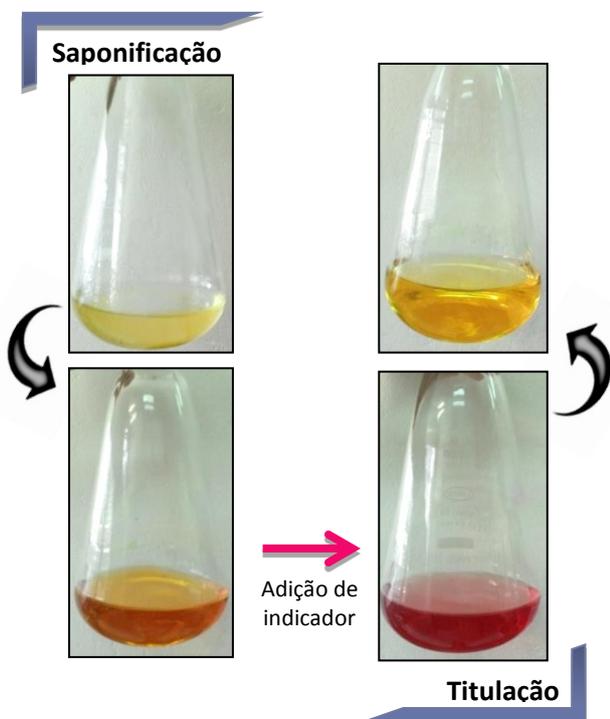


Figura 20 - Coloração obtida para processamento térmico a 180°C (índice de saponificação)

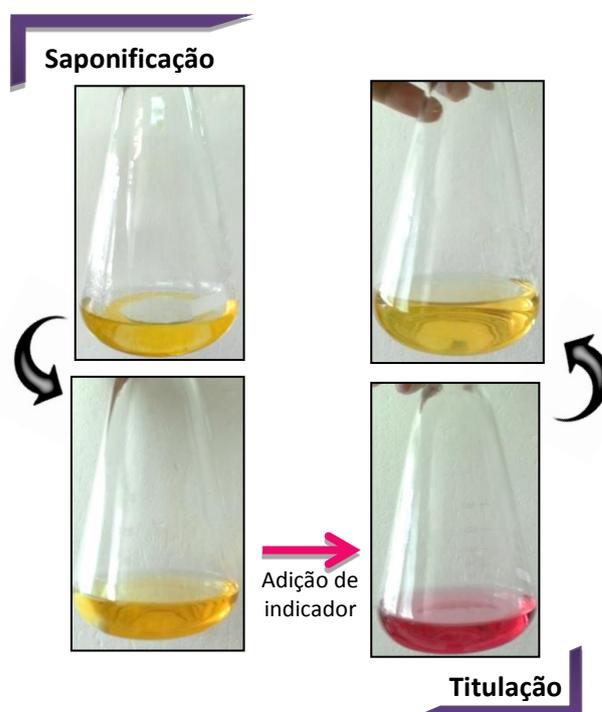


Figura 21 - Coloração obtida para a ausência de processamento térmico (índice de saponificação)

Na Farmacopeia Portuguesa VII, 2002 a equação descrita é:

$$IS = \frac{28,05 \times (V_b - V_a)}{m_a} \quad [17]$$

onde,

V_b = volume, em mL, de ácido clorídrico consumido na titulação do ensaio em branco;

V_a = volume, em mL, de ácido clorídrico utilizado na determinação da amostra;

m_a = massa, expressa em g, correspondente à amostra.

3.2.2.8. COEFICIENTES DE EXTINÇÃO

Neste método o azeite é dissolvido num solvente apropriado para determinar os valores de absorvância da solução nos comprimentos de onda especificados, utilizando o solvente puro como referência. Estes valores são expressos sob a forma de extinção específica - $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (extinção de uma solução a 1 % da matéria gorda no solvente específico, num percurso ótico de 1 cm), normalmente designado por K (coeficiente de extinção).

Material

- Balão volumétrico de 25 mL;
- *Cuvette* de vidro;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta graduada de 2 e 5 mL.

Reagentes

- Ciclohexano, (Sigma-Aldrich, CAS:110-82-7).

Equipamentos

- Balança analítica, (Precisa, modelo 180 A, precisão $\pm 10^{-4}$ g);
- Espectrofotómetro, (Shimadzu, modelo UV – 1700 Pharmaspec).

Procedimento experimental

A determinação dos coeficientes de extinção foi efetuada conforme o método descrito no Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho (Anexo IX), posteriormente alterado pelo Regulamento de Execução (UE) n.º 299/2013 da Comissão, de 26 de Março (Anexo I).

Para este método foram preparadas duas soluções para a mesma amostra: (i) Solução A, para a determinação dos coeficientes de extinção específica a 270 nm (K_{270}); (ii) Solução B, para a determinação dos valores dos coeficientes de extinção específica a 232 nm (K_{232}).

Num balão volumétrico de 25 mL colocaram-se aproximadamente 0.25 g da amostra, perfazendo o restante volume com ciclohexano - Solução A.

Após homogeneização, efetuaram-se as leituras de absorvâncias no espectrofotómetro a 270 nm, bem como a 266 e a 274 nm a fim de calcular, respetivamente, o coeficiente de extinção e a variação do valor absoluto da extinção específica (ΔK).

A Solução B foi preparada a partir da Solução A, transferindo um determinado volume para um novo balão volumétrico de 25 mL, perfazendo o restante com ciclohexano. De acordo com as amostras, o volume transferido foi de 4 mL para as amostras A, T, R e M, e de 2 mL para a amostra B. Seguidamente procedeu-se à medição das absorvâncias no espectrofotómetro no comprimento de onda de 232 nm, sendo que os valores experimentais obtidos deviam estar compreendidos entre 0,1 e 0,8.

As medições de absorvância foram efetuadas em triplicado para todos os comprimentos de onda analisados.

Os coeficientes de extinção reportados foram determinados pela aplicação da equação (Regulamento de Execução (UE) n.º 299/2013 da Comissão, de 26 de Março (Anexo I)):

$$K_{\lambda} = \left(\frac{A_{\lambda}}{c \times s} \right) \quad [18]$$

onde,

K_{λ} = coeficiente de extinção no comprimento de onda λ ;

A_{λ} = absorvância medida no comprimento de onda λ ;

c = concentração da solução, expressa em g/100 mL;

s = espessura da *cuvette* de vidro, em cm.

Por sua vez, a variação do valor da extinção específica foi dada por (Regulamento de Execução (UE) n.º 299/2013 da Comissão, de 26 de Março (Anexo I)):

$$\Delta K = \left| K_{270} - \left(\frac{K_{266} + K_{274}}{2} \right) \right| \quad [19]$$

em que,

ΔK = variação da extinção específica;

K_{270} = extinção específica a 270 nm;

K_{266} = extinção específica a 266 nm;

K_{274} = extinção específica a 274 nm.

3.2.3. ANÁLISE DO TEOR DE FENÓIS

3.2.3.1. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais foi aplicado o método de Folin-Ciocalteu que se baseia na reação do reagente de mesmo nome com os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos (Hrncirik e Fritsche, 2004).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste numa mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico (coloração amarela). Os compostos fenólicos reduzem este reagente formando um complexo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria.

Os resultados reportados consistem nos valores médios das análises referentes aos triplicados dos extratos, sendo expressos em mg de ácido cafeico por litro ($\text{mg}_{\text{ácido cafeico}}/\text{L}$).

A. Preparação de extratos das amostras de azeite

Material

- Balões volumétricos de 10 mL;
- Copo de precipitação;
- Pipetas de Pasteur;
- Pipeta graduada de 2 e 3 mL;
- Proveta graduada de 100 mL;
- Tubos Falcon de 15 mL.

Reagentes

- Metanol - para cromatografia em fase líquida LC/MS, (Merck, CAS: 67-56-1);
- Metanol a 80% (V/V): Metanol - para cromatografia em fase líquida LC/MS, (Merck, CAS: 67-56-1);
- Ácido fórmico, (Sigma-Aldrich, CAS: 64-18-6);
- Acetonitrilo, (Sigma-Aldrich, CAS: 75-05-8).

Equipamento

- Balança analítica, (Mettler Toledo, modelo AB 204, precisão $\pm 10^{-4}$ g);
- Centrífuga, (Eppendorf, modelo 5810 R);
- Rotor Basculante, (Eppendorf, modelo A-4-62, Máx. RFC $3,150 \times g$ (4,000 rpm));
- Rotavapor, (Büchi, modelo R – 114, Intervalo de velocidade 5 - 240 rpm);
- Banho acoplado ao rotavapor, (Büchi, modelo B - 480, Intervalo de temperatura 20 - 100°C);
- Vórtex, (Scientific Industries, INC., modelo K – 550 – GE).

Procedimento experimental

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método utilizado por Capannesi et al., 2000 e Tasioula-Margari e Okogeri, 2001 com algumas modificações.

Pesaram-se aproximadamente 2 g de cada amostra, em triplicado, em tubos Falcon de 15 mL aos quais se adicionaram 3 mL de metanol. Os tubos foram agitados no vórtex durante 5 minutos e centrifugados a 4000 rpm, durante 40 minutos, a uma temperatura de 10°C. Obtiveram-se assim duas fases, a superior límpida e a inferior amarela, sendo retirado com o auxílio de uma pipeta graduada o sobrenadante para outro tubo Falcon vazio. Ao conteúdo restante nos tubos Falcon adicionaram-se 3 mL de metanol seguidos de agitação no vórtex durante 5 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados em condições idênticas, obtendo-se o mesmo resultado. Com o auxílio de uma pipeta graduada, o sobrenadante foi retirado para o tubo Falcon contendo a primeira fase metanólica. Assim, a técnica aplicada envolve duas extracções.

Posteriormente o metanol presente no Falcon com as duas fases metanólicas foi evaporado à secura num rotavapor. Após a evaporação procedeu-se à lavagem da amostra com 2 mL de metanol a 80%, sendo os extratos resultantes armazenados em *vials* de cor âmbar.

B. Reta de Calibração

O composto padrão a utilizar deve ser escolhido de acordo com a amostra que se pretende analisar. Para este ensaio seleccionou-se o ácido cafeico.

Material

- Copo de precipitação;
- Micropipeta (P1000, P200, P100, P10);
- Pipeta graduadas de 5 mL;
- Proveta graduada de 100 mL;
- Tubos Falcon de 15 mL.

Reagentes

- Ácido Cafeico, (Sigma-Aldrich, CAS: 331-39-5);
- Metanol - para cromatografia em fase líquida LC/MS, (Merck, CAS: 67-56-1);
- Metanol a 80% (V/V): Metanol - para cromatografia em fase líquida LC/MS, (Merck, CAS: 67-56-1);
- Reagente Folin-Ciocalteu, (Sigma-Aldrich);
- Carbonato de sódio a 35% (V/V): Carbonato de sódio, (Merck, CAS: 497-19-8).

Equipamento

- Balança analítica, (Mettler Toledo, modelo AB 204, precisão $\pm 10^{-4}$ g);
- Vórtex, (Scientific Industries, INC., modelo K – 550 – GE).

Procedimento experimental

A preparação das soluções padrão foi baseada no método utilizado por Bester et al., 2008 e Mello e Pinheiro, 2012, com algumas modificações.

Foram pesados 5 mg de ácido cafeico num tubo Falcon de 15 mL e adicionou-se metanol até perfazer um volume de 5 mL, seguindo-se a sua homogeneização - solução mãe (1000 mg/L). A partir desta solução foi preparada uma outra de 100 mg/L. Para isso, retiraram-se 500 μ L da solução mãe para um tubo Falcon e adicionou-se metanol a 80% de forma a perfazer um volume final de 5 mL.

As soluções padrão necessárias à elaboração da reta de calibração foram efetuadas utilizando a solução de 100 mg/L como referência. Assim, foram transferidos diferentes volumes desta solução para tubos Falcon cuja diluição se efetuou com água desionizada até 5 mL (Tabela 4). Os padrões encontravam-se num intervalo de concentrações de 0,2 a 6 ppm. Destas novas soluções foram desprezados 1500 µL, originando um volume final de 3,5 mL.

As soluções padrão foram preparadas aquando da análise, embora a solução mãe possa ser armazenada em refrigeração por 3 dias.

Após a preparação das soluções, adicionaram-se 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu sendo os tubos depois homogeneizados no vórtex. Após 3 minutos em repouso, juntaram-se 400 µL de carbonato de sódio (35%) e procedeu-se à sua homogeneização. Os tubos foram então armazenados no escuro durante 1 hora e posteriormente efetuaram-se as leituras das absorvâncias a 725 nm.

Tabela 4 - Preparação das soluções de ácido cafeico

Volume (µL) da solução de ácido cafeico 100 mg/L	[Ácido cafeico] mg/L
10	0,2
15	0,3
20	0,4
25	0,5
50	1
100	2
150	3
200	4
250	5
300	6

C. Determinação do teor de fenóis totais

Material

- Copo de precipitação;
- *Cuvette* de vidro;
- Micropipeta (P1000, P200, P100, P10);
- Proveta graduada de 100 mL;
- Tubos de ensaio;
- Tubos Falcon de 15 mL.

Reagentes

- Reagente Folin-Ciocalteu, (Sigma-Aldrich);
- Carbonato de sódio a 35% (V/V): Carbonato de sódio, (Merck, CAS: 497-19-8).

Equipamento

- Vórtex, (Scientific Industries, INC., modelo K – 550 – GE);

- Espectrofotómetro, (Shimadzu, modelo UV – 1700 Pharmaspec).

Procedimento experimental

A composição em fenóis totais foi determinada pelo método utilizado por Capannesi et al., 2000, com algumas modificações.

Num tubo de ensaio foram colocados 40 μL dos extratos bem como 3960 μL de água desionizada, obtendo-se um volume total de 4000 μL . A estes foram retirados 500 μL para corresponder ao volume final das soluções padrão (3,5 mL).

Aos 3,5 mL dos extratos adicionaram-se 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (cor amarela) e homogeneizou-se no vórtex. Após 3 minutos em repouso, adicionaram-se 400 μL de carbonato de sódio a 35%, procedendo-se depois à sua agitação. Foi visível a alteração da coloração para azul acinzentado. As soluções permaneceram armazenadas ao abrigo da luz por um período de 1 hora. Após o repouso observaram-se diferentes tonalidades de azul, influenciadas pelo conteúdo dos tubos (Figura 22). Por último, efetuaram-se as medições das absorvâncias a um comprimento de onda de 725 nm.

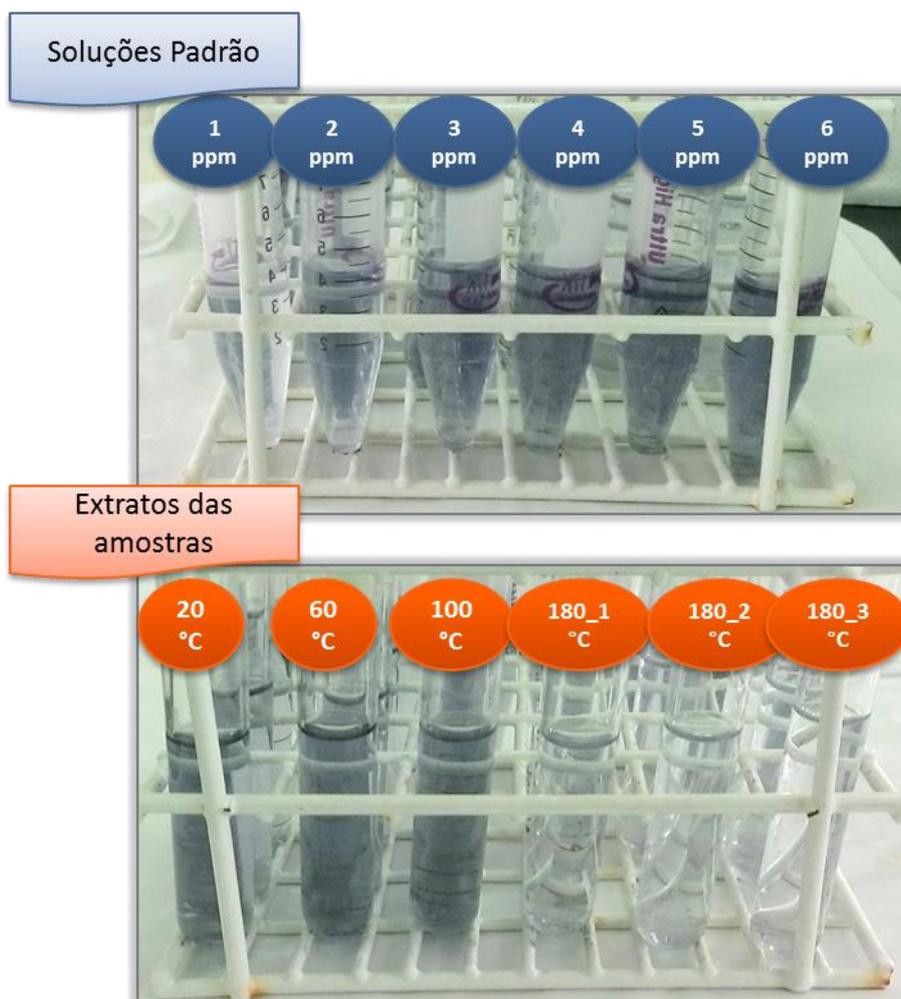


Figura 22 - Coloração obtida referente ao método de Folin-Ciocalteu

3.2.3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

O método consiste na injeção de uma toma da amostra, previamente dissolvida num solvente orgânico (metanol), utilizando um sistema HPLC com um detetor de díodos.

A. Preparação de extratos das amostras de azeite

Os extratos foram obtidos pela técnica descrita na secção 3.2.3.1.A.

B. Análise por HPLC

O sistema de cromatografia líquida de alta resolução utilizado foi um Thermo Finnigan (modelo Surveyor) equipado com amostrador automático, bomba e detetor de díodos (PDA). A temperatura do amostrador automático situava-se a 12°C.

A separação cromatográfica dos compostos foi efetuada numa coluna Lichrocart RP-18 (250 x 4 mm, tamanho de partículas: 5 µm, Merck) e numa pré-coluna Manu-cart® RP-18, mantidas a uma temperatura constante de 35°C.

O detetor foi programado para analisar entre 192 e 798 nm a uma velocidade de 1Hz com uma largura de banda de 5 nm. A deteção foi monitorizada utilizando três canais individuais 280, 320 e 360 nm, a uma velocidade de 10Hz com uma largura de banda de 11 nm. O volume de injeção aplicado foi de 20 µL.

Os eluentes utilizados consistiram em (i) solução de ácido fórmico p.a. (0,5%) em água Milli-Q® e (ii) 5 mL de ácido fórmico + 900 mL de acetonitrilo de qualidade HPLC + 95 mL de Milli-Q® H₂O, sendo o seu fluxo de 0,300 mL/min.

O tempo total de corrida foi de 130 minutos.

CAP. 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos necessários à execução deste trabalho, nomeadamente a média, o desvio padrão e as equações dos respetivos índices, foram efetuados com o *software* Microsoft Excel 2010. Os gráficos apresentados no Capítulo 5 foram também efetuados com o auxílio do mesmo.

Para tratamento estatístico mais pormenorizado recorreu-se ao *software* SPSS - PASW Statistics 18.0, efetuando-se as seguintes análises, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$):

- (i) Análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey com o intuito de determinar as diferenças significativas entre os grupos estudados;
- (ii) Análise de regressão linear;
- (iii) Ensaios de correlação através da determinação dos coeficientes de correlação de Pearson;
- (iv) Análise por Componentes Principais (PCA).

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão.

Neste capítulo apresentamos os resultados obtidos nos diversos ensaios realizados, os quais foram alvo de tratamento estatístico.

Os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos são comparados com a legislação vigente para inferir sobre a qualidade dos azeites em estudo, nas condições selecionadas.

Desde já é de salientar que a qualidade alimentar deve ser interpretada na sua globalidade, pelo que esta divisão de conteúdos é apenas uma estratégia organizativa.

5.1. ANÁLISE REOLÓGICA

Nesta secção são apresentados os resultados do efeito da temperatura sobre a viscosidade através da avaliação da energia de ativação, bem como as observações referentes ao comportamento reológico dos diferentes azeites nos processamentos térmicos especificados.

Os dados da viscosidade reportados neste trabalho referem-se aos valores médios resultantes de leituras em triplicado para cada valor de velocidade rotacional selecionada. Por sua vez, os valores da tensão de corte foram determinados multiplicando a viscosidade pela respetiva velocidade de corte.

5.1.1. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A VISCOSIDADE - ENERGIA DE ATIVAÇÃO

Conforme referido na secção 3.1.1.1., com o intuito de obter a energia de ativação de fluxo a partir da expressão de Arrhenius (secção 2.4.3., equação 3), foram avaliadas quatro amostras (Azeite A, T, R e M), a catorze velocidades de corte para seis temperaturas distintas.

Foram traçados gráficos de tensão de corte ou de cisalhamento (σ [Pa]) em função da velocidade de corte ($\dot{\gamma}$ [s^{-1}]) com o intuito de determinar, para cada temperatura, o valor da viscosidade dinâmica ($\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]). Assim, aplicou-se a equação de Newton aos pares de valores [$\dot{\gamma}$, σ] dos azeites estudados, obtendo-se os elementos de regressão apresentados na Tabela 5. Para todos os ajustes efetuados, observam-se boas correlações lineares entre a tensão de corte e a velocidade de corte (coeficientes de determinação superiores a 0,99). Estes resultados comprovam que os azeites analisados se comportam como fluidos newtonianos, tal como já havia sido constatado por Fasina et al., 2006, Brock et al., 2008, Kim et al., 2010, Bonnet et al., 2011 e Gila et al., 2014.

Uma vez que todas as amostras exibem um padrão de escoamento semelhante, encontra-se representada apenas uma curva de fluxo a título exemplificativo (Figura 23).

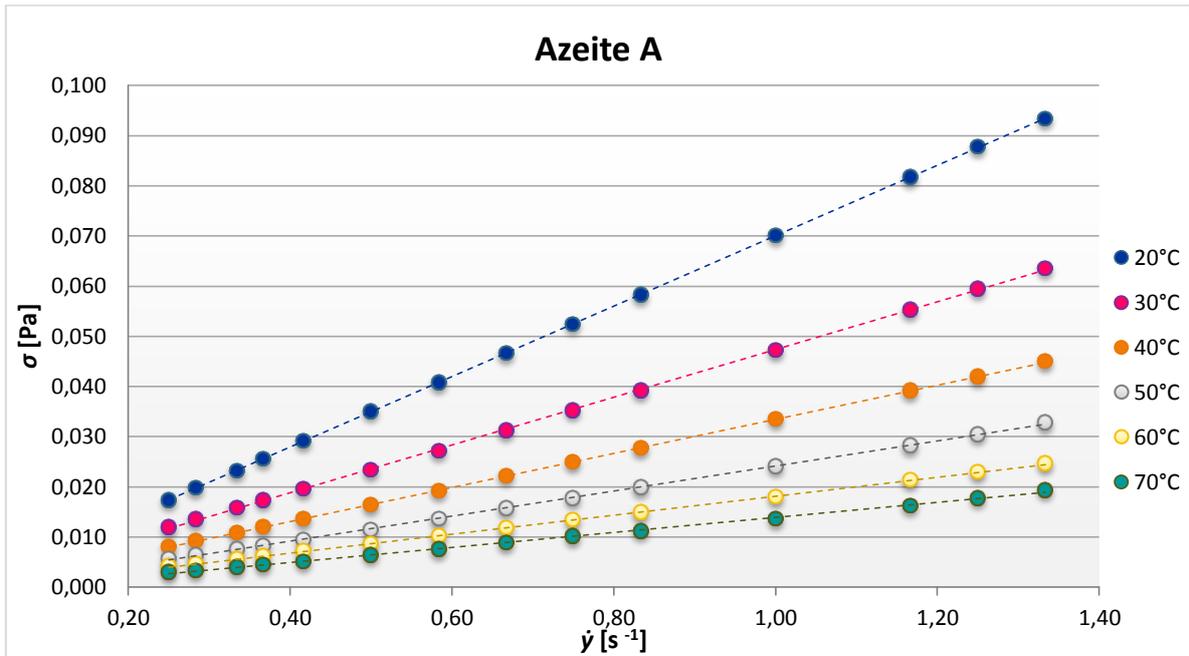


Figura 23 - Curvas de fluxo tensão de corte em função da velocidade de corte para todas as temperaturas de trabalho (azeite A)

Tabela 5 - Equações resultantes do ajuste ao modelo newtoniano e respectivas viscosidades dinâmicas para diferentes temperaturas

Azeite	t [°C]	Equação de Newton	R ²	η(γ̇) [Pa.s]
A	20	$\sigma = 0,0702\dot{\gamma} - 0,0002$	1,0000	0,0702
	30	$\sigma = 0,0476\dot{\gamma} - 0,0003$	0,9998	0,0476
	40	$\sigma = 0,034\dot{\gamma} - 0,0005$	0,9999	0,0340
	50	$\sigma = 0,025\dot{\gamma} - 0,0009$	0,9997	0,0250
	60	$\sigma = 0,0188\dot{\gamma} - 0,0007$	0,9997	0,0188
	70	$\sigma = 0,0149\dot{\gamma} - 0,001$	0,9987	0,0149
T	20	$\sigma = 0,0665\dot{\gamma} - 0,0005$	1,0000	0,0665
	30	$\sigma = 0,0459\dot{\gamma} - 0,0002$	0,9999	0,0459
	40	$\sigma = 0,0329\dot{\gamma} - 0,0007$	0,9998	0,0329
	50	$\sigma = 0,0241\dot{\gamma} - 0,0004$	0,9995	0,0241
	60	$\sigma = 0,0188\dot{\gamma} - 0,0007$	0,9995	0,0188
	70	$\sigma = 0,0157\dot{\gamma} - 0,001$	0,9984	0,0157
R	20	$\sigma = 0,0678\dot{\gamma} - 0,0011$	0,9999	0,0678
	30	$\sigma = 0,0469\dot{\gamma} + 0,0004$	0,9999	0,0469
	40	$\sigma = 0,0337\dot{\gamma} + 0,0005$	0,9997	0,0337
	50	$\sigma = 0,0235\dot{\gamma} - 0,0003$	0,9980	0,0235
	60	$\sigma = 0,0189\dot{\gamma} - 0,0006$	0,9950	0,0189
	70	$\sigma = 0,0158\dot{\gamma} - 0,001$	0,9904	0,0158
M	20	$\sigma = 0,0671\dot{\gamma} + 0,0001$	0,9999	0,0671
	30	$\sigma = 0,0472\dot{\gamma} + 0,0001$	0,9998	0,0472
	40	$\sigma = 0,0333\dot{\gamma} - 0,0004$	0,9996	0,0333
	50	$\sigma = 0,0247\dot{\gamma} - 0,0006$	0,9995	0,0247
	60	$\sigma = 0,0194\dot{\gamma} - 0,0008$	0,9987	0,0194
	70	$\sigma = 0,0157\dot{\gamma} - 0,0007$	0,9980	0,0157

A análise da Tabela 5 mostra que a variação dos valores da viscosidade ($\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]) para as amostras estudadas se situa nos intervalos [0,0702-0,0655], [0,0476-0,0459], [0,0340-0,0329], [0,0250-0,0241], [0,0188-0,0188] e [0,0149-0,0157], respetivamente na gama de temperaturas [20, 30, 40, 50, 60 e 70°C]. Na literatura consultada não foram encontrados valores uniformizados deste parâmetro reológico para azeites virgem extra. Todavia, foram encontradas informações referentes às categorias de azeites e de azeites virgens, para as temperaturas analisadas, com valores superiores relativamente aos resultados obtidos e que se indicam na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de viscosidade referidos na literatura

t [°C]	$\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]		
	Fasina et al., 2006	Bonnet et al., 2011	Gila et al., 2014
	<i>Azeite</i>	<i>Azeite Virgem</i>	<i>Azeite Virgem</i>
20	0,09	0,082	0,084 - 0,076
30	-	0,054	0,057 - 0,049
40	-	0,038	0,038 - 0,034
50	0,03	0,029	-

A representação gráfica da viscosidade em função da temperatura permite inferir sobre a relação entre as duas variáveis. Assim, todas as amostras apresentam um decréscimo exponencial da viscosidade com o aumento da temperatura (Figura 24). Esta relação constitui um fator importante no processo de produção de azeite visto que, a temperaturas reduzidas, o azeite virgem extra apresenta maior viscosidade, logo menor fluidez, sendo conseqüentemente necessário um maior dispêndio energético para bombear o azeite, por exemplo.

Este efeito da temperatura sobre a viscosidade pode ser explicado pelo maior movimento térmico entre as moléculas, aumentando as distâncias intermoleculares e, conseqüentemente, reduzindo as forças intermoleculares bem como o atrito. Isto facilita o escoamento entre elas, culminando na diminuição da viscosidade (Santos et al., 2005, Canciam, 2010 e Kim et al., 2010).

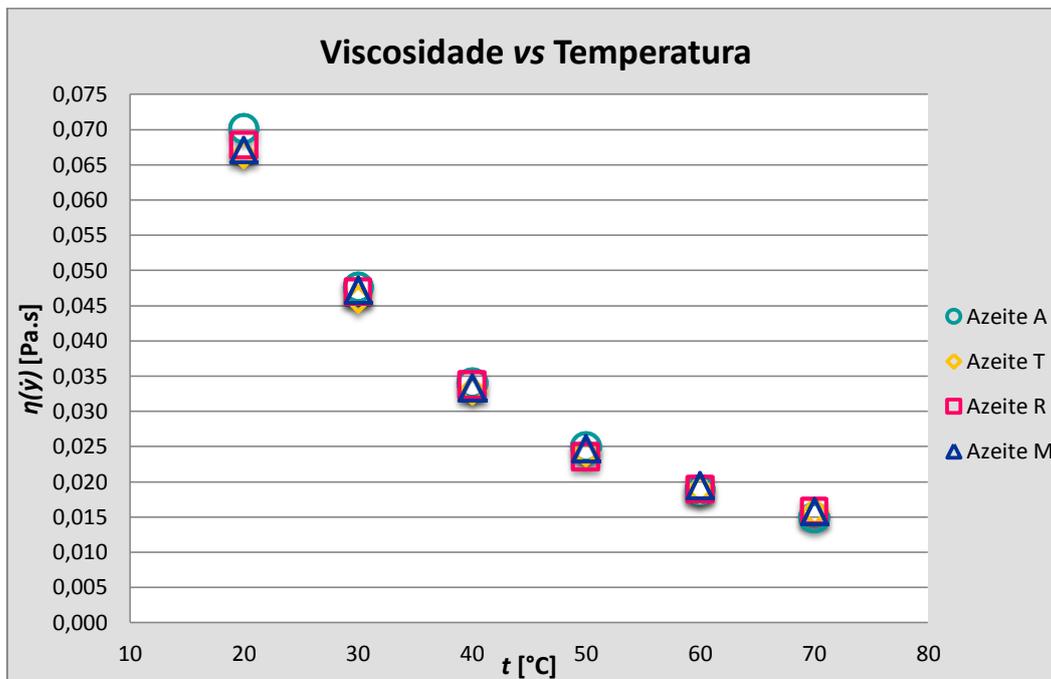


Figura 24 - Relação entre a viscosidade dinâmica e a temperatura

Na Figura 24 é também possível observar-se que o decréscimo da viscosidade é maior na fase inicial do incremento da temperatura, e à medida que a viscosidade evolui para a região de temperaturas mais elevadas, a sua diminuição é menos acentuada.

Os valores da viscosidade são muito semelhantes entre os azeites virgem extra analisados embora estes possuam diferenças na sua composição química. Como refere Bonnet et al., 2011, a composição em ácidos gordos e triacilgliceróis tem uma variância intravarietal muito menor que a variância intervarietal, ou seja, existem diferenças mais acentuadas entre variedades diferentes comparativamente à mesma variedade de azeitonas. Como resultado, para a mesma cultivar as diferenças da viscosidade não são mensuráveis. No presente estudo, as amostras provêm de algumas cultivares em comum pelo que os valores de viscosidade não diferem muito. Não obstante, o decréscimo da viscosidade com o aumento da temperatura foi mais acentuado no azeite A, enquanto a variação foi menor nos azeites M e T.

Refira-se a este propósito que os resultados obtidos estão de acordo com os previamente reportados por diversos autores (Abramovic e Klofutar, 1998, Fasina et al., 2006, Brock et al., 2008, Giap et al., 2009, Kim et al., 2010, Bonnet et al., 2011 e Gila et al., 2014).

Com vista à determinação da energia de ativação de fluxo, calcularam-se os inversos das temperaturas termodinâmicas e os logaritmos das viscosidades dinâmicas dos azeites em análise, sendo posteriormente aplicada a estes dados a equação de Arrhenius (Figura 25 e Tabela 7).

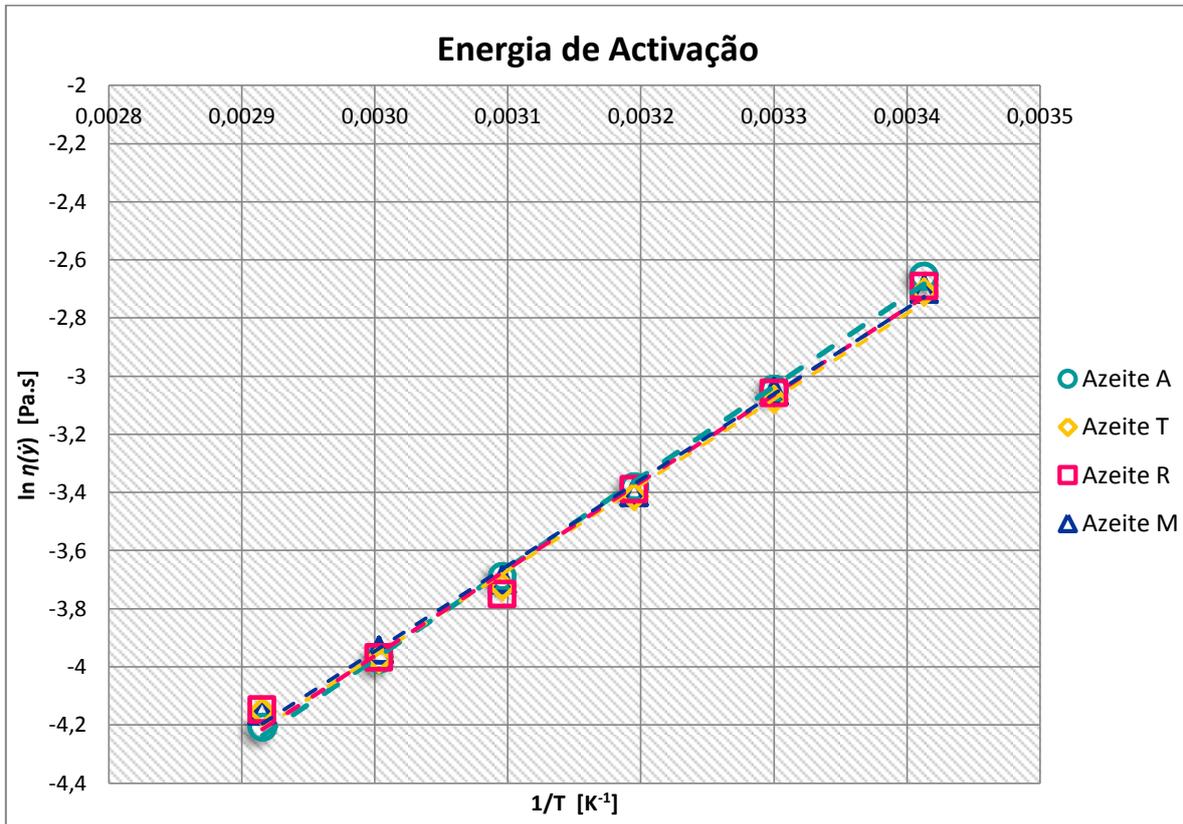


Figura 25 - Variação do logaritmo da viscosidade dinâmica em função do inverso da temperatura

Observou-se um ajuste adequado ao modelo arrheniano, evidenciado pelos elevados valores de R^2 , onde o aumento da temperatura se traduz na diminuição da viscosidade (Figura 25 e Tabela 7). Tal como foi constatado pela análise anterior, as amostras em estudo descrevem o mesmo comportamento, visível pela sobreposição dos resultados experimentais.

A energia de ativação (Ea) e o fator pré-exponencial (η_0) foram calculados, respetivamente, a partir do declive e da ordenada na origem da reta de regressão referente ao ajuste da equação de Arrhenius aos resultados experimentais.

Tabela 7 - Parâmetros da equação de Arrhenius

Azeite	Equação de Regressão	R^2	Ea (kJ.mol ⁻¹)	$\ln \eta_0$	η_0 (Pa.s)
A	$\ln \eta(\dot{\gamma}) = 3122,8\left(\frac{1}{T}\right) - 13,341$	0,9986	25,9630	-13,341	1,607E-06
T	$\ln \eta(\dot{\gamma}) = 2943,5\left(\frac{1}{T}\right) - 12,793$	0,9949	24,4723	-12,793	2,78E-06
R	$\ln \eta(\dot{\gamma}) = 2991,5\left(\frac{1}{T}\right) - 12,936$	0,9924	24,8713	-12,936	2,41E-06
M	$\ln \eta(\dot{\gamma}) = 2947,9\left(\frac{1}{T}\right) - 12,789$	0,9968	24,5088	-12,789	2,791E-06

A Tabela 7 indica que a energia de ativação de fluxo varia entre 24,4723 kJ.mol⁻¹ e 25,9630 kJ.mol⁻¹, enquanto os valores de η_0 situam-se entre 1,607E-06 e 2,791E-06 Pa.s. Os resultados obtidos estão de acordo com os previamente reportados na literatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de energia de ativação de fluxo descritos na literatura

<i>E_a</i> (kJ.mol ⁻¹)					
Canciam, 2010	Giap, 2010	Kim et al., 2010	Ashrafi, 2012	Ashrafi, 2012	Gila et al., 2014
<i>Azeite</i>	<i>Azeite</i>	<i>Azeite</i>	<i>Azeite</i>	<i>Azeite Virgem Extra</i>	<i>Azeite Virgem</i>
27,7778	23,8	26,9	23,7	29,2	30,650 - 33,635

O aumento da energia de ativação de fluxo reflete o aumento da sensibilidade da viscosidade à variação da temperatura (Giap et al., 2009, Canciam, 2010, Giap, 2010, Kim et al., 2010 e Ashrafi, 2012), ou seja, uma alta energia de ativação de fluxo implica que são apenas necessárias pequenas variações de temperatura para modificarem a viscosidade. Em suma, quando ocorrem alterações na temperatura, os fluidos com alta energia de ativação de fluxo sofrem uma grande variação na sua viscosidade.

Pela análise da Figura 25 e da Tabela 7 constata-se que não existem diferenças acentuadas entre as amostras relativamente à energia de ativação de fluxo, embora o azeite A seja considerado estatisticamente diferente dos restantes azeites. Mesmo assim, o azeite A exhibe um valor de energia de ativação superior e conseqüentemente a sua viscosidade parece ser mais afectada pelas variações de temperatura. Por sua vez, os azeites M e T são supostamente menos sensíveis uma vez que apresentam os menores valores de energia de ativação de fluxo.

Interpretando todos os resultados descritos anteriormente, verifica-se que o azeite A exhibe valores de energia de ativação de fluxo superiores aos outros azeites, remetendo para uma diminuição mais acentuada da viscosidade em função do aumento da temperatura. Este facto foi confirmado uma vez que o azeite A, de entre todos, apresenta a maior variação dos valores da viscosidade com a temperatura. Perante os resultados obtidos, é recomendável uma maior precaução na produção, manuseamento e armazenamento do azeite A uma vez que as suas propriedades reológicas se alteram com maior facilidade devido às variações de temperatura.

Canciam, 2010 realizou um estudo comparativo entre determinados óleos vegetais, incluindo o azeite, e sugeriu que existe uma correlação entre a concentração de ácidos gordos e os parâmetros reológicos dos óleos vegetais. Os óleos vegetais que continham maior quantidade de ácidos gordos monoinsaturados apresentaram valores de energia de ativação elevados, enquanto uma maior concentração de ácidos gordos polinsaturados correspondia a menores valores de energia de ativação. As mesmas conclusões foram reportadas também por Kim et al., 2010.

Com o intuito de realizar uma comparação semelhante, efetuou-se uma análise de correlação entre a energia de ativação e o índice de iodo, cuja determinação permite avaliar o grau de insaturação dos ácidos gordos. Porém, o índice de iodo (secção 5.2.5.) não permite a distinção entre ácidos gordos mono e polinsaturados. Os resultados obtidos sugerem que ao maior grau de insaturação corresponde o menor valor de energia de ativação e vice-versa, indicado pelas amostras T e A, respetivamente.

5.1.2. AVALIAÇÃO REOLÓGICA

Nesta secção apresentam-se os resultados das medidas de viscosidade e das análises referentes ao comportamento reológico dos diferentes azeites obtidas à temperatura ambiente e a três temperaturas que correspondem a vários processos térmicos culinários.

Com o intuito de determinar o seu comportamento reológico, foram avaliados os reogramas de tensão de cisalhamento (σ [Pa]) em função da velocidade de corte ($\dot{\gamma}$ [s^{-1}]), bem como reogramas de viscosidade ($\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]) para os processamentos térmicos em estudo. Posteriormente procedeu-se ao ajuste das equações dos modelos reológicos da Lei de Newton (secção 2.4.2.1, equação 1) e da Lei da Potência (secção 2.4.2.2, equação 2) aos valores experimentais.

Como referido na secção 3.1.1.2., as amostras foram pré-aquecidas a três temperaturas ($60 \pm 10^\circ C$; $100 \pm 5^\circ C$; $180 \pm 10^\circ C$) e posteriormente arrefecidas naturalmente até à temperatura ambiente, sendo então medida a viscosidade com o intuito de avaliar a influência da degradação térmica sobre este parâmetro reológico dos azeites.

Azeite A

Os reogramas que se seguem traduzem o ajuste das equações reológicas da Lei de Newton e da Lei da Potência aos dados experimentais (tensão de corte, velocidade de corte) para as amostras A. Estão apenas exemplificados os tratamentos referentes a duas amostras deste azeite uma vez que o procedimento se aplica de igual modo a todas as temperaturas.

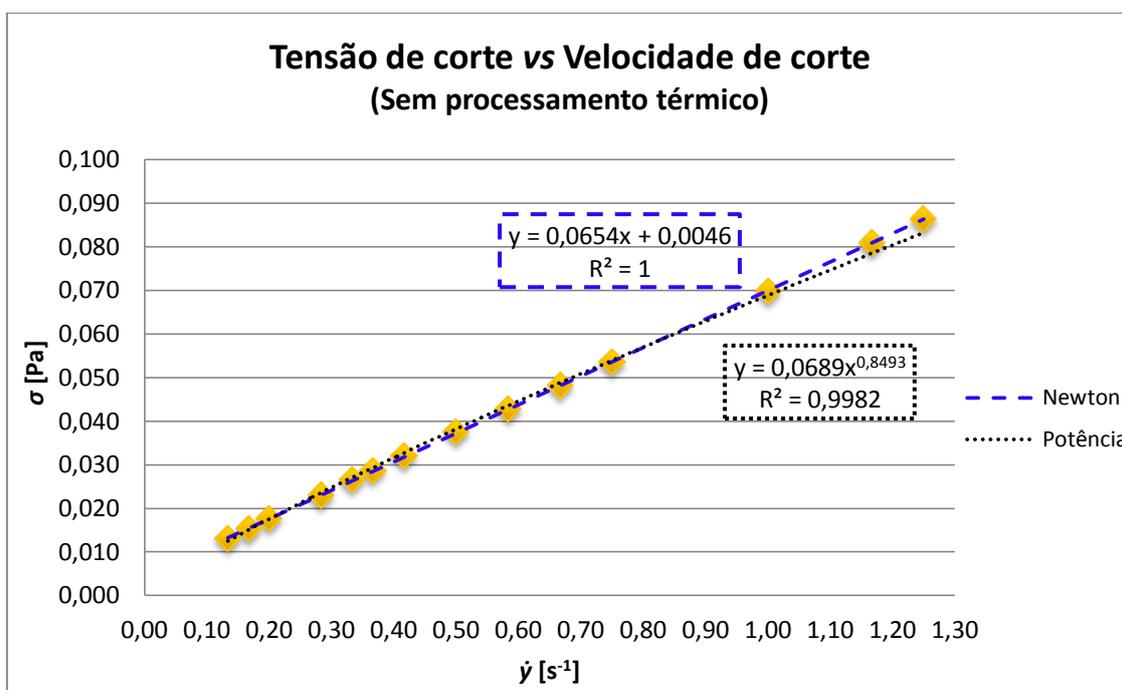


Figura 26 – Curva de fluxo da tensão de corte vs velocidade de corte para o azeite A ($t = 20^\circ C$)

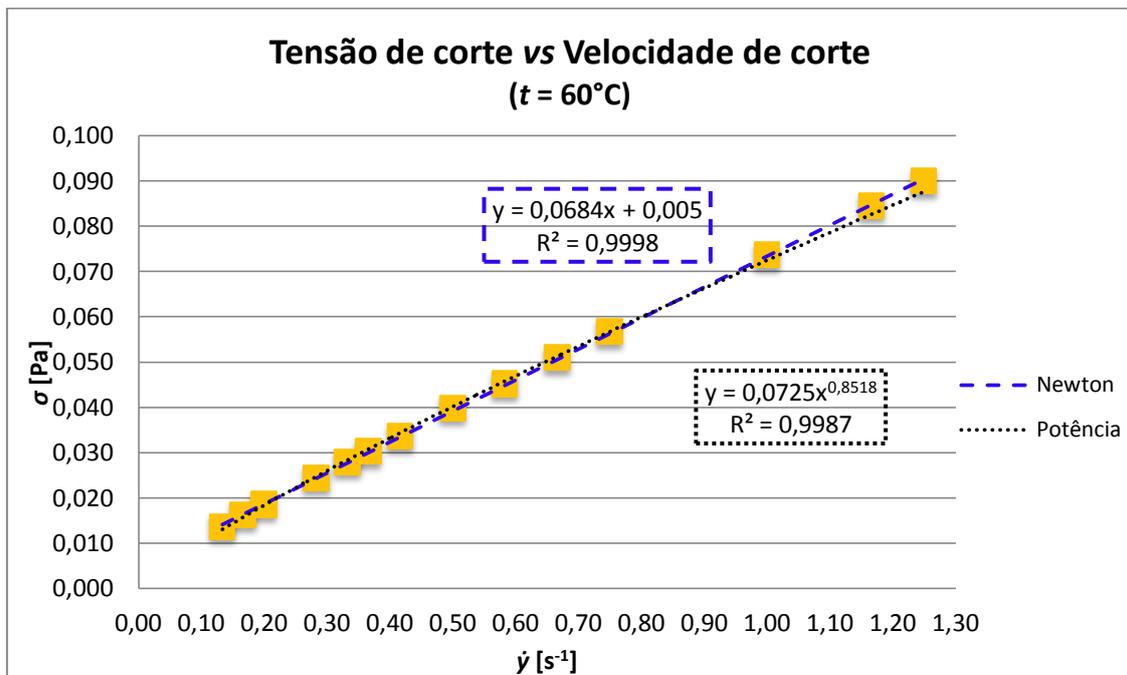


Figura 27 – Curva de fluxo da tensão de corte vs velocidade de corte para o azeite A ($t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)

As Figuras 26 e 27 mostram os resultados obtidos após a aplicação dos dois modelos reológicos aos dados experimentais relativos às amostras do azeite A (sem tratamento térmico e após aquecimento a 60°C). Ambas as figuras evidenciam uma linha reta resultante da relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de corte. Baseando a análise no critério dos valores dos coeficientes de determinação do ajuste à Lei de Newton e do ajuste à Lei da Potência, os resultados sugerem um comportamento newtoniano. Na Tabela 9 verifica-se que a equação de Newton continua a ser a mais adequada para as restantes temperaturas de processamento utilizadas para o azeite A. Desta forma, com valores de R^2 compreendidos entre 0,9989 e 1,0000 o modelo newtoniano ajusta-se melhor, independentemente da temperatura a que as amostras foram submetidas.

O comportamento reológico sugerido pelos ajustes indicados pode ser confirmado através da análise da curva de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte (Figura 28).

Tabela 9 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite A)

$t\text{ }[^{\circ}\text{C}]$	Modelo Reológico	Equação	R^2	$\eta(\dot{\gamma})\text{ [Pa.s]}$
20	Newton	$y = 0,0654x + 0,0046$	1,0000	0,0654
	Potência	$y = 0,0689x^{0,8493}$	0,9982	-
60	Newton	$y = 0,0684x + 0,005$	0,9998	0,0684
	Potência	$y = 0,0725x^{0,8518}$	0,9987	-
100	Newton	$y = 0,0717x - 0,0007$	0,9999	0,0717
	Potência	$y = 0,0709x^{1,0174}$	0,9998	-
180 ciclo 1	Newton	$y = 0,0721x - 0,0011$	0,9990	0,0721
	Potência	$y = 0,0696x^{0,9961}$	0,9969	-
180 ciclo 2	Newton	$y = 0,0733x - 0,001$	0,9994	0,0733
	Potência	$y = 0,0713x^{1,0023}$	0,9981	-
180 ciclo 3	Newton	$y = 0,0776x - 0,0006$	0,9989	0,0776
	Potência	$y = 0,0754x^{0,9783}$	0,9977	-

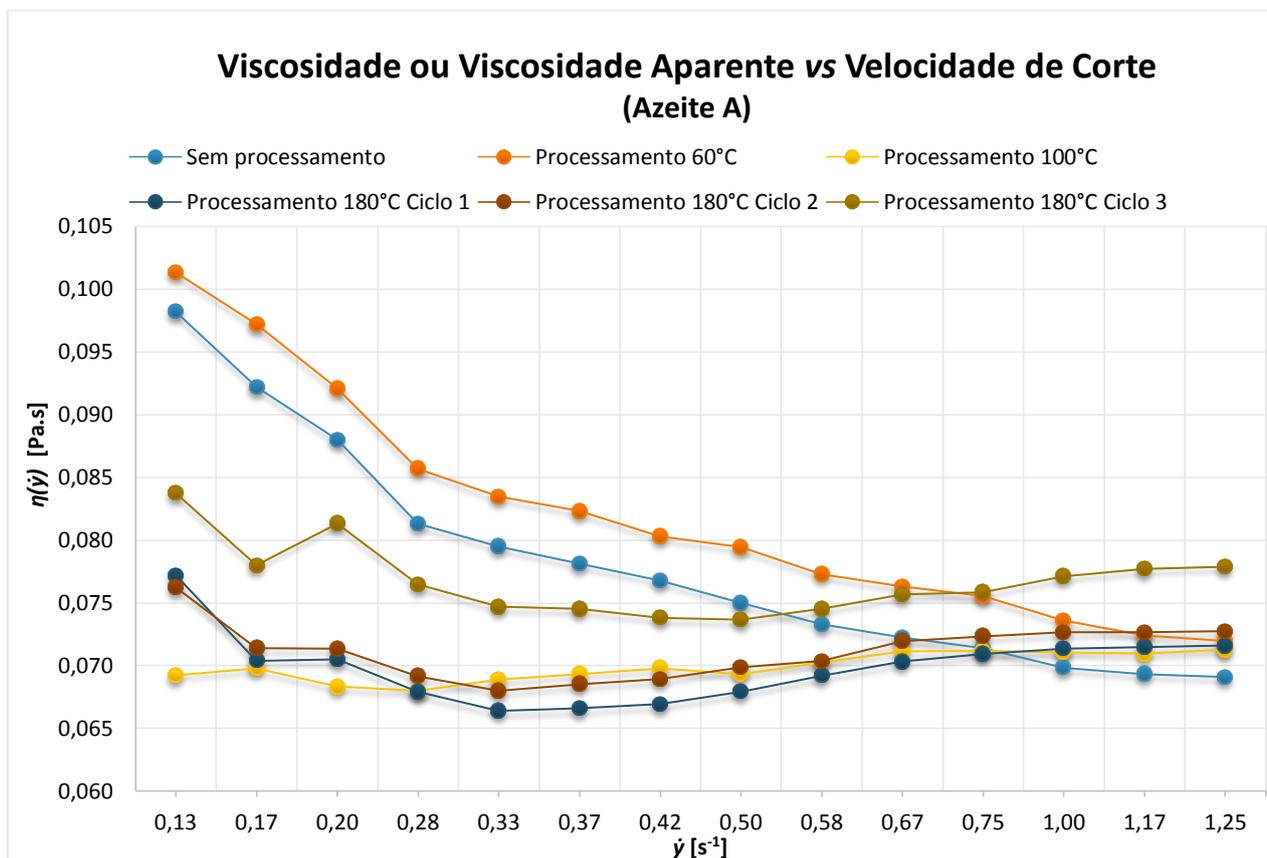


Figura 28 - Representação gráfica da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite A)

Relativamente às amostras sem processamento bem como às amostras aquecidas a 60°C, a Figura 28 evidencia o decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de corte, sendo esta mais visível nas velocidades de corte mais baixas. Estes perfis caracterizam um comportamento não-newtoniano (reofluidificante). Contudo, de acordo com os resultados descritos anteriormente (Tabela 9), os dados são melhor representados pela Lei de Newton para além de mostrarem uma relação linear entre a tensão de corte e a velocidade de corte (Figuras 26 e 27). Assim, os resultados para estes processamentos são inconclusivos, sendo necessária uma nova determinação da viscosidade aparente que envolva um intervalo de velocidades de corte mais amplo.

A amostra aquecida a 100°C parece comportar-se como um fluido newtoniano uma vez que a sua viscosidade não varia consideravelmente nas velocidades de corte selecionadas (Figura 28). Este comportamento é corroborado pelos valores de R^2 obtidos para ambos os ajustes (Tabela 9), bem como pelo valor do parâmetro n da equação da Lei da Potência que é aproximadamente igual a 1.

Nos ciclos de fritura, os perfis apresentados são semelhantes, verificando-se pequenas variações da viscosidade. Assim, nos processamentos térmicos mais agressivos, a viscosidade considera-se independente da velocidade de corte para estas amostras, sugerindo um comportamento newtoniano. Observam-se também valores crescentes deste parâmetro reológico com o número de ciclos, registando-se os valores mais elevados de viscosidade no terceiro ciclo de frituras.

Os resultados obtidos sugerem que o azeite A é um fluido newtoniano após processamentos térmicos a 100°C e a 180°C, e nas restantes temperaturas estudadas os resultados são inconclusivos.

Foram traçados reogramas individuais que demonstram a relação entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de corte para cada temperatura correspondente a um processamento térmico. No entanto, apresenta-se somente a representação gráfica referente ao processamento a 60°C, a título de exemplo, uma vez que se observou uma correlação linear entre σ e $\dot{\gamma}$ em todos os processamentos efetuados (Figura 29).

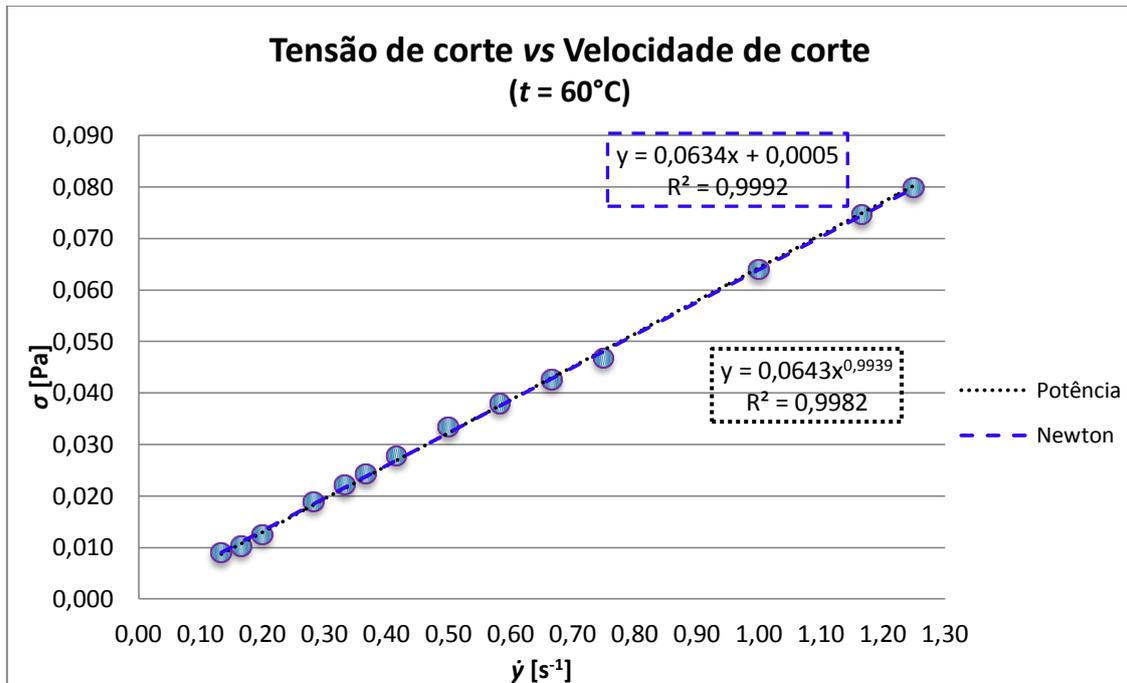


Figura 29 – Curva de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte do azeite B ($t = 60^\circ\text{C}$)

Para além da linearidade observada, o azeite B apresenta elevados valores de R^2 , nomeadamente para os ajustes ao modelo de Newton, relativos a todos os processamentos térmicos a que as amostras foram submetidas, indicando um comportamento newtoniano (Tabela 10). No entanto, para a temperatura de 100°C observaram-se ajustes muito semelhantes a ambos os modelos, apesar do índice de escoamento do fluido (n) da equação da Lei da Potência se situar muito próximo da unidade, remetendo para um comportamento newtoniano.

Tabela 10 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite B)

t [°C]	Modelo Reológico	Equação	R^2	$\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]
20	Newton	$\gamma = 0,0656x - 0,0005$	1,0000	0,0656
	Potência	$\gamma = 0,0654x^{1,0242}$	0,9998	-
60	Newton	$\gamma = 0,0634x + 0,0005$	0,9992	0,0634
	Potência	$\gamma = 0,0643x^{0,9939}$	0,9982	-
100	Newton	$\gamma = 0,0689x - 0,0002$	0,9999	0,0689
	Potência	$\gamma = 0,069x^{1,0169}$	0,9998	-
180 ciclo 1	Newton	$\gamma = 0,0748x - 0,0011$	0,9988	0,0748
	Potência	$\gamma = 0,0721x^{0,9917}$	0,9973	-
180 ciclo 2	Newton	$\gamma = 0,0755x - 0,001$	0,9988	0,0755
	Potência	$\gamma = 0,073x^{0,9895}$	0,9969	-
180 ciclo 3	Newton	$\gamma = 0,0789x - 0,001$	0,9995	0,0789
	Potência	$\gamma = 0,0768x^{1,001}$	0,9984	-

A Figura 30 retrata as curvas de fluxo da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para o azeite B nas condições de processamento em estudo.

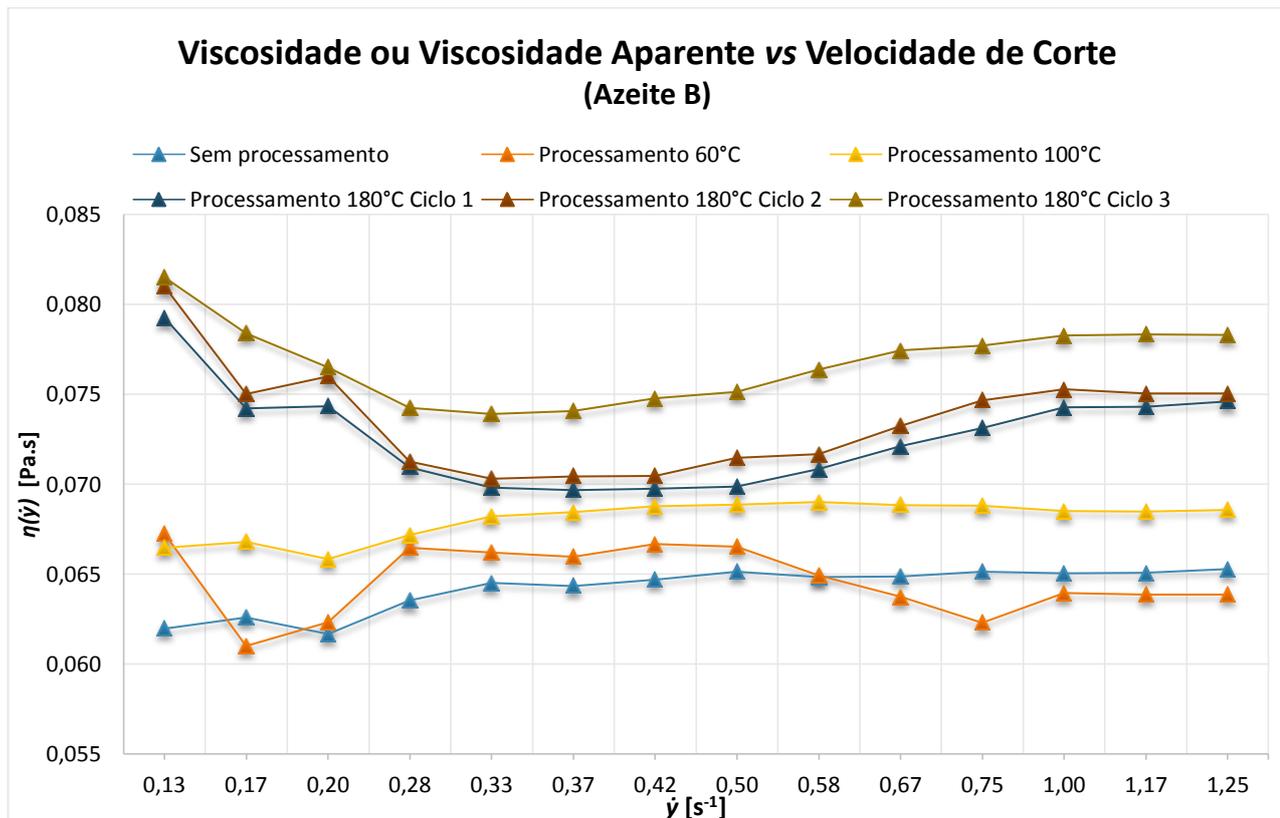


Figura 30 - Curvas de fluxo relativas à viscosidade ou viscosidade aparente do azeite B para todas as condições de processamento

A viscosidade parece ser constante quando a amostra não é sujeita a processamento e quando é sujeita a processamentos a 100°C, ainda que varie nas velocidades de corte iniciais.

A viscosidade aparente da amostra aquecida a 60°C sofre variações, designadamente nas velocidades de corte mais baixas, revelando depois uma tendência linear seguida de um decréscimo. De modo a inferir sobre este comportamento é necessário analisar também o valor do índice de escoamento (n) indicado pela equação da Lei da Potência. Na Tabela 10 verifica-se que o valor de n é muito próximo de 1, confirmando um comportamento newtoniano.

Por último, os ciclos de fritura parecem apresentar valores de viscosidade mais elevados, sendo os do terceiro ciclo os maiores (Figura 30). Verifica-se também que exibiram perfis muito semelhantes.

Adicionalmente, é possível observar que na fase das velocidades de corte superiores, nomeadamente de 1,00 a 1,25 s⁻¹, a viscosidade mostra-se constante para todas as temperaturas.

De um modo geral verifica-se que a viscosidade é independente da velocidade de corte visto que pode ser considerada constante ao longo das velocidades de corte seleccionadas.

Tendo em consideração os resultados referentes à tensão de corte bem como à viscosidade, o azeite B comporta-se como fluido newtoniano.

Azeite T

Os ajustes aos modelos de Newton e da Lei da Potência permitem discriminar o comportamento reológico das amostras. Neste caso, a análise do valor de R^2 demonstra que, em todas as temperaturas, o melhor ajuste corresponde ao de Newton (Tabela 11). As amostras revelam uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a velocidade de corte, comum a todas as temperaturas, apresentando-se por isso, e a título exemplificativo, a curva de fluxo referente ao aquecimento a 100°C (Figura 31).

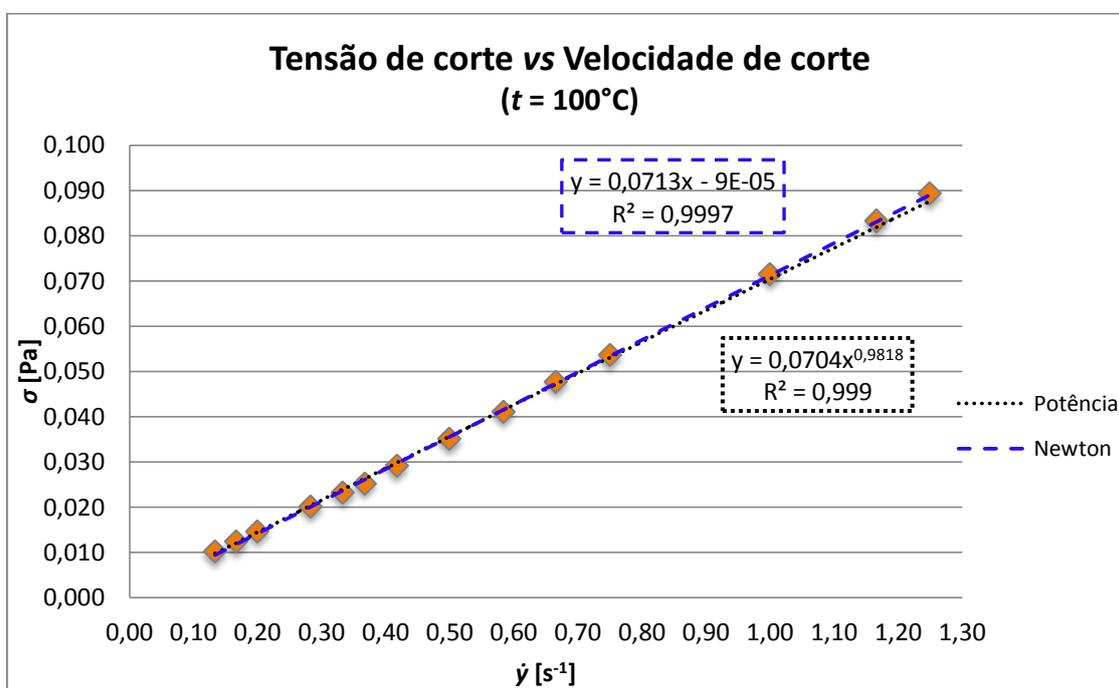


Figura 31 - Curva de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte para o azeite T ($t = 100^\circ\text{C}$)

Tabela 11 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite T)

t [°C]	Modelo Reológico	Equação	R^2	$\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]
20	Newton	$\gamma = 0,0677x - 0,0001$	1,0000	0,0677
	Potência	$\gamma = 0,0679x^{1,0122}$	0,9998	-
60	Newton	$\gamma = 0,0606x - 0,0005$	0,9999	0,0606
	Potência	$\gamma = 0,0602x^{1,0207}$	0,9999	-
100	Newton	$\gamma = 0,0713x - 9E-05$	0,9997	0,0713
	Potência	$\gamma = 0,0704x^{0,9818}$	0,9990	-
180 ciclo 1	Newton	$\gamma = 0,0723x - 0,0008$	0,9994	0,0723
	Potência	$\gamma = 0,0705x^{0,9973}$	0,9979	-
180 ciclo 2	Newton	$\gamma = 0,0717x - 3E-05$	0,9992	0,0717
	Potência	$\gamma = 0,0704x^{0,9680}$	0,9982	-
180 ciclo 3	Newton	$\gamma = 0,0749x - 7E-05$	0,9988	0,0749
	Potência	$\gamma = 0,0731x^{0,9592}$	0,9964	-

A Figura 32 apresenta as curvas de fluxo da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para o azeite T.

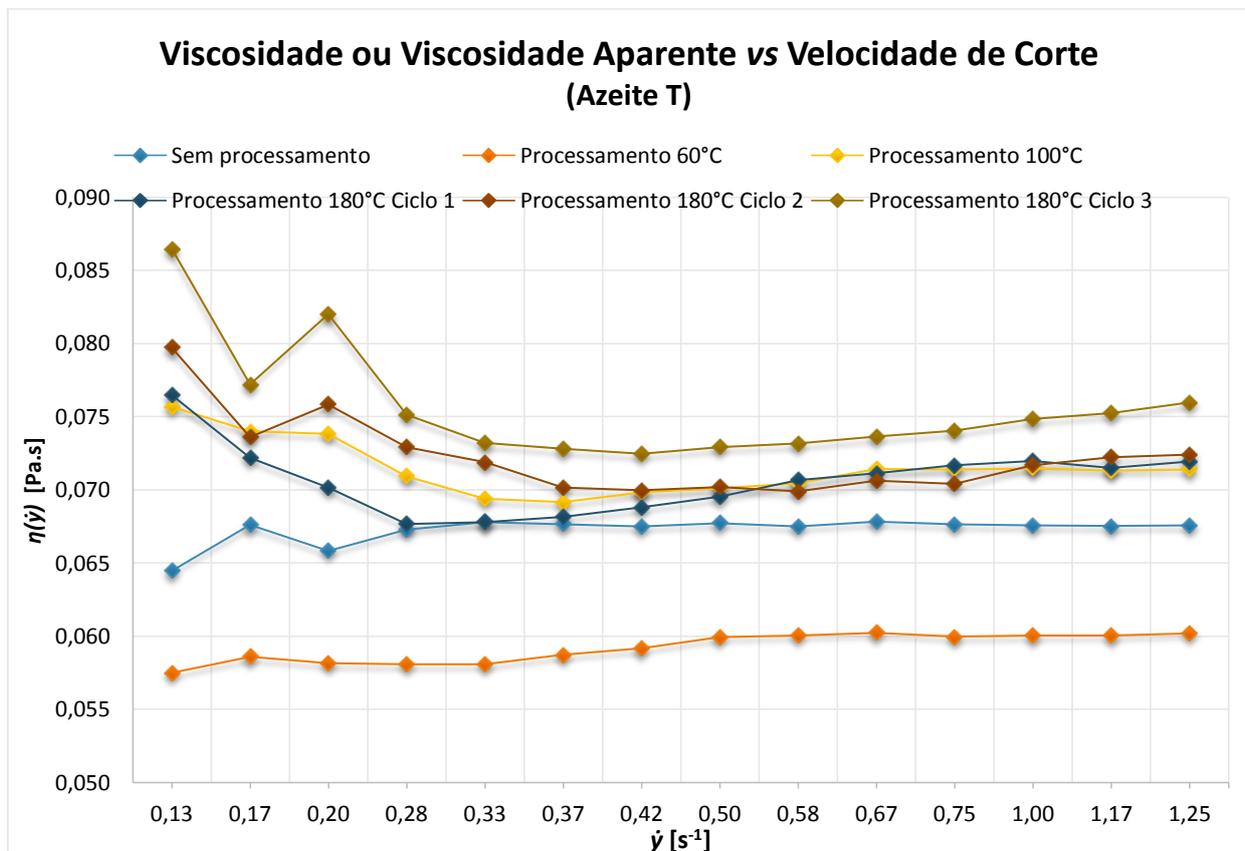


Figura 32 - Valores de viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite T)

Na condição de ausência de processamento térmico, a viscosidade parece não variar dentro do intervalo de velocidades de corte estudado, revelando uma tendência linear. O mesmo se verifica para os valores relativos à temperatura de processamento de 60°C (Figura 32).

Na amostra aquecida a 100°C observa-se que, embora os valores da sua viscosidade manifestem variações na região das velocidades de corte mais baixas, os valores de viscosidade são constantes nas restantes velocidades de corte.

Os ciclos de 180°C parecem descrever o mesmo comportamento, em que a viscosidade não se altera com o aumento das velocidades de corte, exceto para o primeiro ciclo onde a viscosidade aparente parece aumentar ligeiramente. Neste último caso, contudo, o valor do parâmetro n da equação da Lei da Potência é aproximadamente igual a 1 (Tabela 11), sugerindo um comportamento newtoniano. Assim, o perfil observado não é característico de um fluido newtoniano sendo por isso necessária uma avaliação a um maior número de velocidades de corte para a obtenção de resultados mais corretos.

Os resultados que constam da Tabela 11 e das Figuras 31 e 32 sugerem um comportamento newtoniano para o azeite T, comum entre as diferentes temperaturas de processamento estudadas.

Azeite R

A Figura 33 apresenta, a título de exemplo, a curva de fluxo correspondente ao primeiro ciclo do processamento a 180°C.

O azeite R comportou-se do mesmo modo em todos os processamentos térmicos estudados no que diz respeito à tensão de corte, sendo esta diretamente proporcional à velocidade de corte (Figura 33).

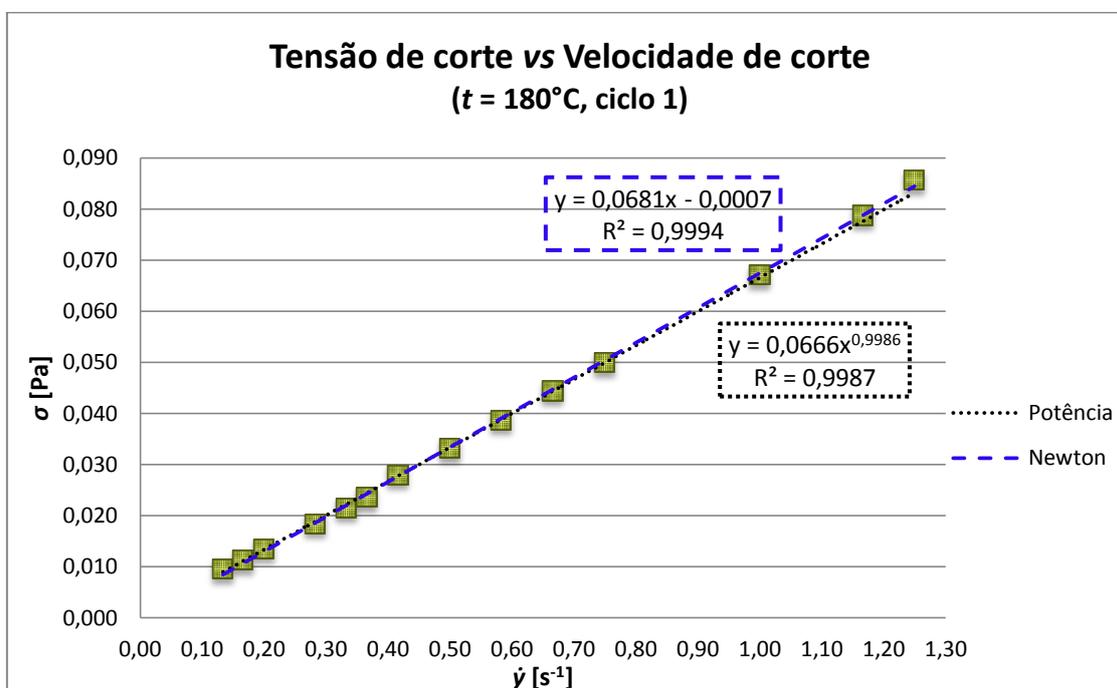


Figura 33 - Relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte referente ao azeite R ($t = 180^{\circ}\text{C}$, ciclo 1)

Na Tabela 12 estão descritas as equações resultantes dos ajustes linear e potencial bem como os respectivos coeficientes de determinação (R^2). O modelo da Lei da Potência apresenta coeficientes de determinação elevados embora sejam ligeiramente inferiores aos do modelo da Lei de Newton, cujo ajuste aos dados experimentais é mais adequado. Adicionalmente, o índice de escoamento (n) referente à equação da Lei da Potência é muito próximo de 1 para a grande maioria das temperaturas. Desta forma, as amostras parecem exibir um comportamento newtoniano.

Tabela 12 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite R)

t [°C]	Modelo Reológico	Equação	R^2	$\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]
20	Newton	$\gamma = 0,0694x - 9E-05$	1,0000	0,0694
	Potência	$\gamma = 0,0697x^{1,0122}$	0,9998	-
60	Newton	$\gamma = 0,0681x + 0,0028$	0,9999	0,0681
	Potência	$\gamma = 0,0702x^{0,9040}$	0,9990	-
100	Newton	$\gamma = 0,0732x - 0,0005$	1,0000	0,0732
	Potência	$\gamma = 0,0728x^{1,0154}$	0,9999	-
180 ciclo 1	Newton	$\gamma = 0,0681x - 0,0007$	0,9994	0,0681
	Potência	$\gamma = 0,0666x^{0,9986}$	0,9987	-
180 ciclo 2	Newton	$\gamma = 0,0738x - 0,0012$	0,9995	0,0738
	Potência	$\gamma = 0,0717x^{1,0145}$	0,9994	-
180 ciclo 3	Newton	$\gamma = 0,0777x - 0,0012$	0,9995	0,0777
	Potência	$\gamma = 0,0757x^{1,0111}$	0,9993	-

Como se verifica na Figura 34, a viscosidade aparente apresenta diferenças para os diversos processamentos térmicos.

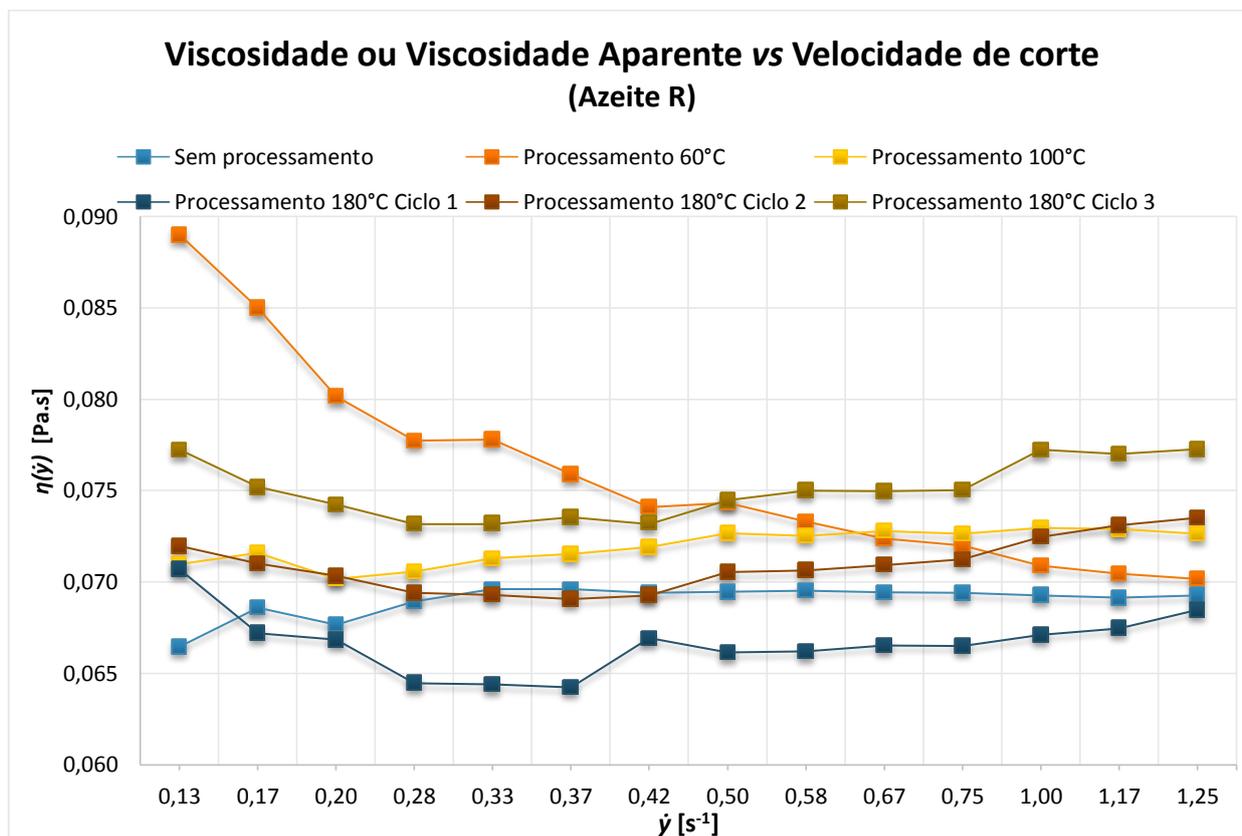


Figura 34 - Curvas de fluxo da viscosidade ou viscosidade aparente e velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite R)

Na ausência de tratamento térmico e também no aquecimento a 100°C a viscosidade parece ser constante no intervalo de velocidades de corte estudadas (Figura 34).

Para as velocidades de corte mais baixas, no primeiro ciclo a 180°C a viscosidade aparente tem tendência a decrescer. No entanto, verifica-se que após os 0,42 s⁻¹ se mantém sensivelmente linear. Os restantes ciclos (180°C – ciclo 2 e 3) apresentam um padrão muito semelhante, verificando-se que a viscosidade é constante, facto que é confirmado pelos valores de n nos ajustes à Lei da Potência apresentados na Tabela 12. Assim, para estas temperaturas o azeite R exhibe um comportamento newtoniano.

Para o processamento a 60°C a viscosidade aparente decresce com as velocidades de corte, indicando um comportamento não-newtoniano (reofluidificante). De facto, o intervalo de velocidades de corte mais baixas evidencia um claro comportamento reofluidificante. Analisando a Tabela 12 referente a este processamento, os dois modelos reológicos não apresentam uma diferença acentuada de R^2 e, quando os valores experimentais são ajustados à Lei da Potência, o valor do índice de escoamento assume valores inferiores a 1. Assim, estes resultados sugerem que o azeite R se comporta como um fluido reofluidificante após aquecimento a 60°C. Contudo, os gráficos da tensão de corte em função da velocidade de corte indicam um comportamento newtoniano, sendo, portanto, necessária uma nova análise com um intervalo de velocidades de corte mais amplo a fim de obter resultados mais conclusivos.

Em suma, a viscosidade apresenta algumas variações mas, de um modo geral, o azeite R exhibe perfis característicos de um fluido newtoniano. Contudo, de acordo com os reogramas da viscosidade aparente, obtida após aquecimento a 60°C, este azeite parece apresentar um comportamento ligeiramente reofluidificante.

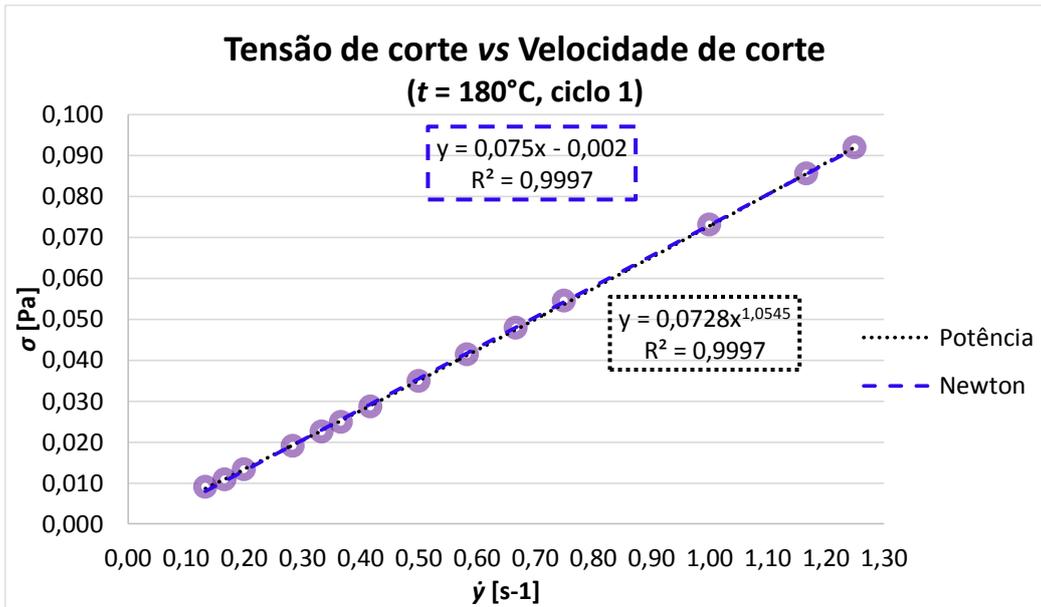
Como exemplo, encontra-se representado na Figura 35 o comportamento reológico do azeite M para os processamentos correspondentes a frituras, sendo possível observar que a tensão de corte aumenta linearmente com a velocidade de corte. Para todas as temperaturas estudadas, o valor de R^2 é muito semelhante, ou idêntico, nos ajustes à Lei de Newton e da Lei da Potência (Tabela 13), sendo portanto imperativo avaliar as curvas de fluxo referentes à viscosidade ou viscosidade aparente.

Tabela 13 - Aplicação da Lei de Newton e da Lei da Potência aos valores experimentais (azeite M)

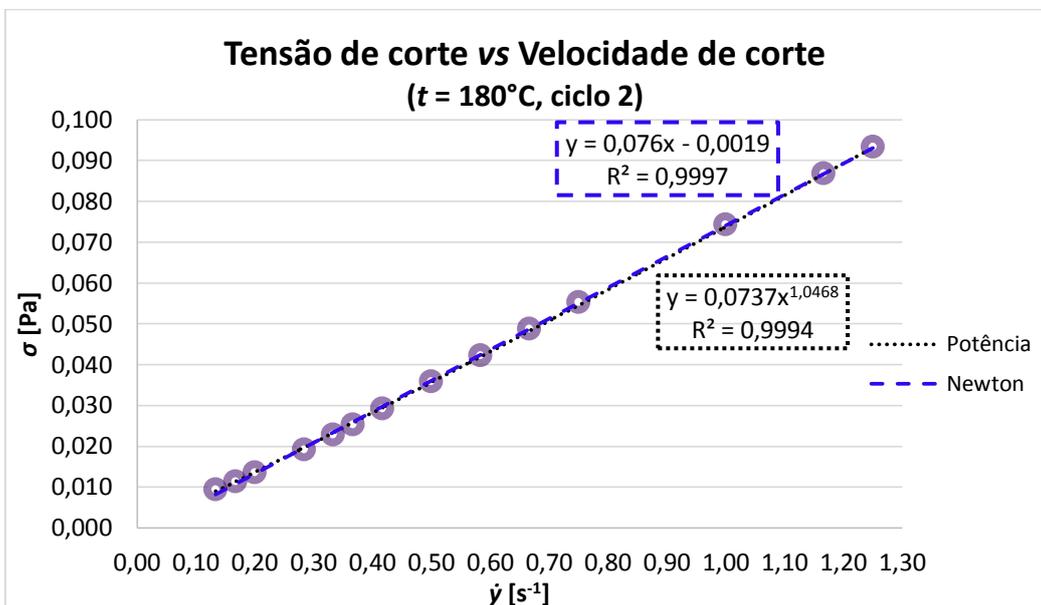
t [°C]	Modelo Reológico	Equação	R^2	$\eta(\dot{\gamma})$ [Pa.s]
20	Newton	$\gamma = 0,0693x - 0,0002$	1,0000	0,0693
	Potência	$\gamma = 0,0695x^{1,0132}$	0,9998	-
60	Newton	$\gamma = 0,0598x - 0,0005$	0,9999	0,0598
	Potência	$\gamma = 0,0597x^{1,0268}$	0,9997	-
100	Newton	$\gamma = 0,075x - 0,0005$	0,9999	0,075
	Potência	$\gamma = 0,0741x^{1,0036}$	0,9998	-
180 ciclo 1	Newton	$\gamma = 0,075x - 0,002$	0,9997	0,075
	Potência	$\gamma = 0,0728x^{1,0545}$	0,9997	-
180 ciclo 2	Newton	$\gamma = 0,076x - 0,0019$	0,9997	0,076
	Potência	$\gamma = 0,0737x^{1,0468}$	0,9994	-
180 ciclo 3	Newton	$\gamma = 0,0777x - 0,002$	0,9997	0,0777
	Potência	$\gamma = 0,0755x^{1,0511}$	0,9996	-

Nas amostras sujeitas a um ciclo de frituras, ambos os modelos geraram R^2 idênticos (Tabela 13). Apesar do valor do parâmetro n da equação da Lei da Potência ser igual a 1,0545, este valor encontra-se muito próximo da unidade podendo assim indicar um comportamento newtoniano. As amostras de azeite M sujeitas a dois ou a três ciclos a 180°C mostram um comportamento análogo (Tabela 13). Deste modo, para este grupo de tratamento térmico ambos os modelos caracterizam um comportamento reológico newtoniano.

(A)



(B)



(C)

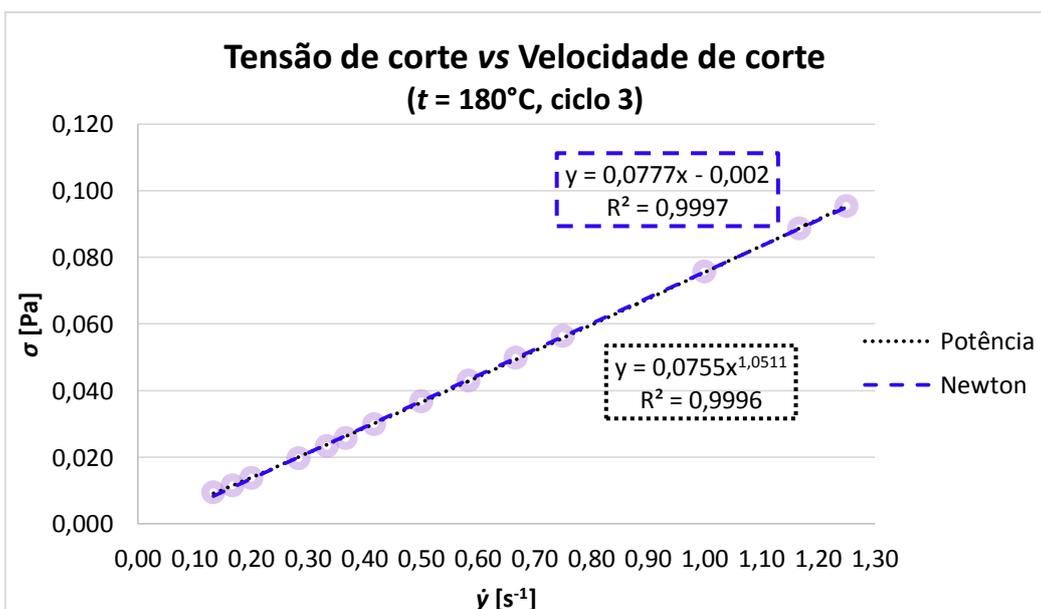


Figura 35 - Relação entre a tensão de corte e a velocidade de corte referente ao azeite M (t = 180°C, ciclo 1, 2 e 3)

A Figura 36 reúne as informações da relação entre a viscosidade ou viscosidade aparente e a velocidade de corte, para os processamentos térmicos em estudo.

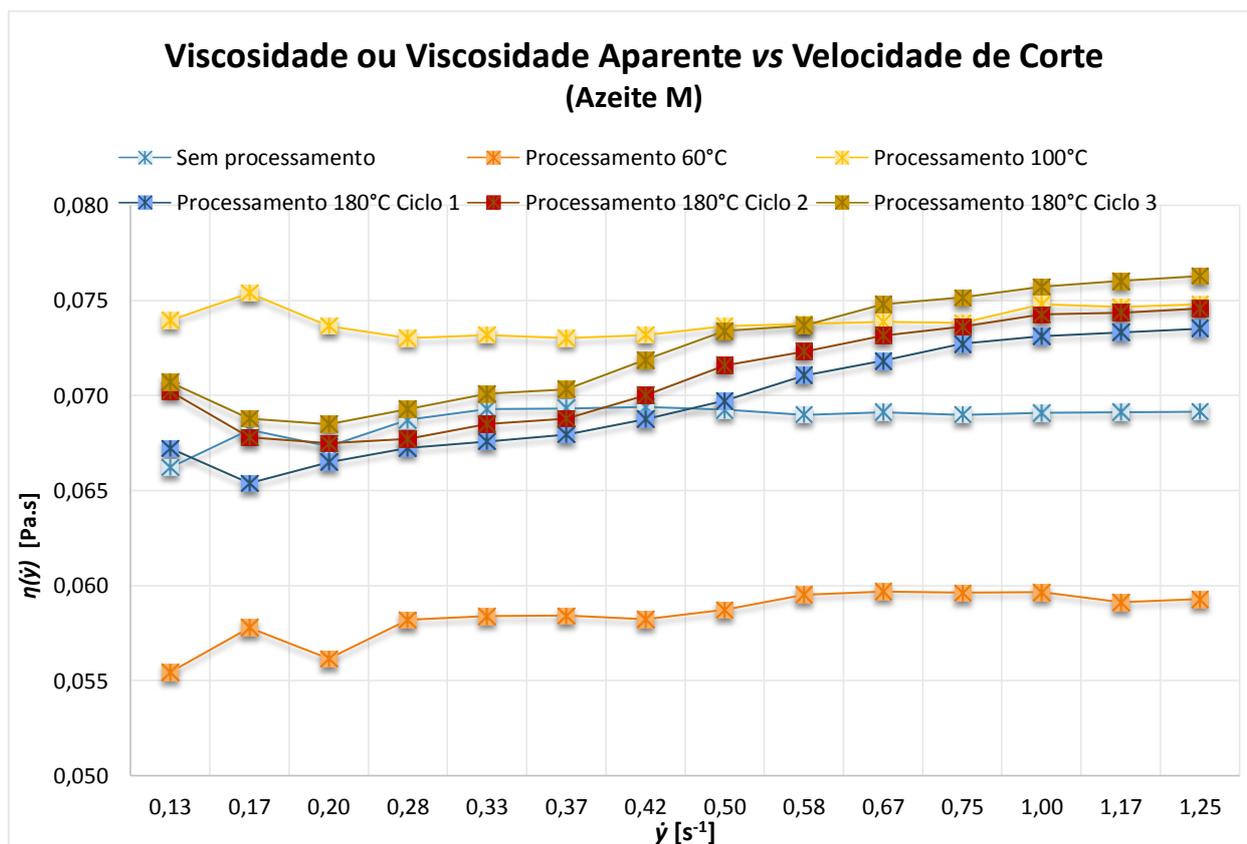


Figura 36 - Reograma da viscosidade ou viscosidade aparente em função da velocidade de corte para todas as condições de processamento (azeite M)

Para as temperaturas de processamento de 20°C, 60°C e 100°C, as curvas de fluxo mostram a existência de ligeiras variações no parâmetro da viscosidade na região das velocidades de corte mais baixas (Figura 36). Nas restantes velocidades de corte a viscosidade parece constante, refletindo o comportamento newtoniano também evidenciado pelas equações de ambos os modelos reológicos (Tabela 13).

As amostras pertencentes ao grupo dos processamentos a 180°C apresentam o mesmo perfil, em que a viscosidade aparente tem tendência a aumentar ligeiramente com o incremento das velocidades de corte, o que poderia sugerir um comportamento reoespessante. Contudo, na região das velocidades de corte mais elevadas, a viscosidade aparente parece manter-se constante. A análise conjunta da Tabela 13 e da Figura 35 indica que os valores do parâmetro n da equação da Lei da Potência, bem como o perfil das curvas de fluxo, sugerem um comportamento newtoniano. No entanto, é importante referir que no âmbito da obtenção de resultados mais coerentes seria necessário utilizar um maior intervalo de velocidades de corte.

De um modo geral, os resultados evidenciam um comportamento newtoniano do azeite M mesmo após aquecimento.

Em resumo, no que concerne aos tratamentos térmicos, vários estudos reológicos anteriormente efetuados (Santos et al., 2005, Kalogianni et al., 2011 e Ashrafi, 2012) indicam que o azeite é um fluido newtoniano mesmo quando sujeito a elevadas temperaturas durante um longo período de tempo. Os

resultados demonstrados neste trabalho são em parte concordantes com esses estudos, confirmando que o processamento térmico provoca alterações na estrutura dos azeites com repercussões na sua viscosidade dinâmica mas os seus efeitos no comportamento reológico não estão claros. Na maioria dos casos, o comportamento verificado foi do tipo newtoniano, uma vez que a viscosidade é independente da velocidade de corte e a tensão de cisalhamento exibe uma relação linear com último parâmetro.

Observou-se uma variação dos valores da viscosidade aparente nas velocidades de corte mais baixas mas que se mantém aproximadamente constante nas velocidades de corte mais altas. A variação da viscosidade descrita nas velocidades de corte mais baixas indica um comportamento não-newtoniano que pode ser explicado pelos baixos valores de momentos de força (torques) obtidos que dificultam a deteção da viscosidade pelo equipamento. Os baixos torques requerem equipamentos mais sensíveis para serem devidamente reportados (Ashrafi, 2012).

Efeito do Tempo

Como se verifica pelo exposto anteriormente, de um modo geral, as amostras comportam-se como fluidos newtonianos para as temperaturas estudadas. Segundo Kim et al., 2010, os óleos vegetais exibem este comportamento devido às suas longas cadeias de moléculas. Contudo, os valores da viscosidade variam distintamente em função do tipo de amostras.

De modo a complementar os resultados, pretendeu-se inferir sobre um possível comportamento não-newtoniano através da avaliação do efeito do tempo na viscosidade. Para esta análise mediu-se a diferença encontrada na variação da função da tensão de corte com a velocidade de corte após submeter a amostra a velocidades de corte crescentes, imediatamente seguida de velocidades decrescentes.

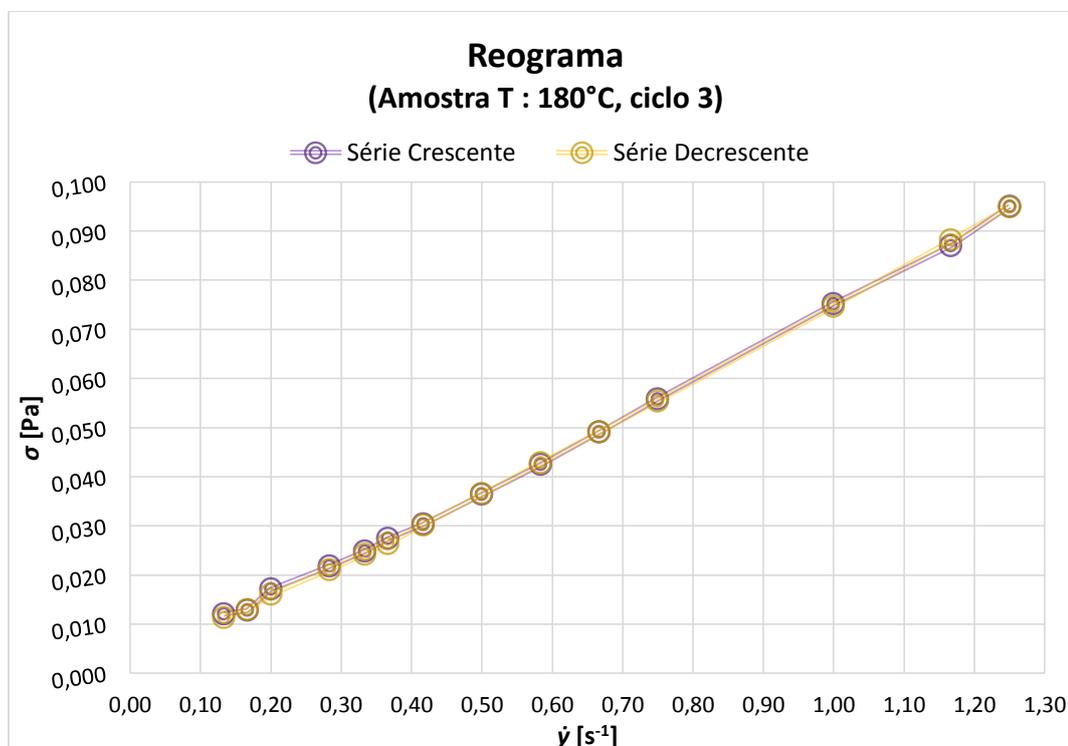


Figura 37 - Avaliação da dependência do tempo para o Azeite T (t=180°C, ciclo 3)

A Figura 37 apresenta, como exemplo, as curvas de fluxo da tensão de corte em função da velocidade de corte para os conjuntos de valores crescentes e decrescentes de σ , referentes ao azeite T submetido ao tratamento térmico de 180°C durante o primeiro ciclo. Da sua observação conclui-se que a sobreposição das curvas das duas séries (crescente e decrescente) reflete a ausência de histerese. Desta forma considera-se inexistente a dependência do tempo, corroborando o comportamento newtoniano observado.

Os restantes azeites analisados apresentaram resultados análogos.

Efeito do Processamento Térmico

Na Figura 38 estão representados os valores de viscosidade obtidos para cada amostra, bem como a sua variação de acordo com as condições de aquecimento. Os valores desta propriedade reológica foram determinados através da equação de Newton (correspondente ao melhor ajuste já anteriormente mencionado).

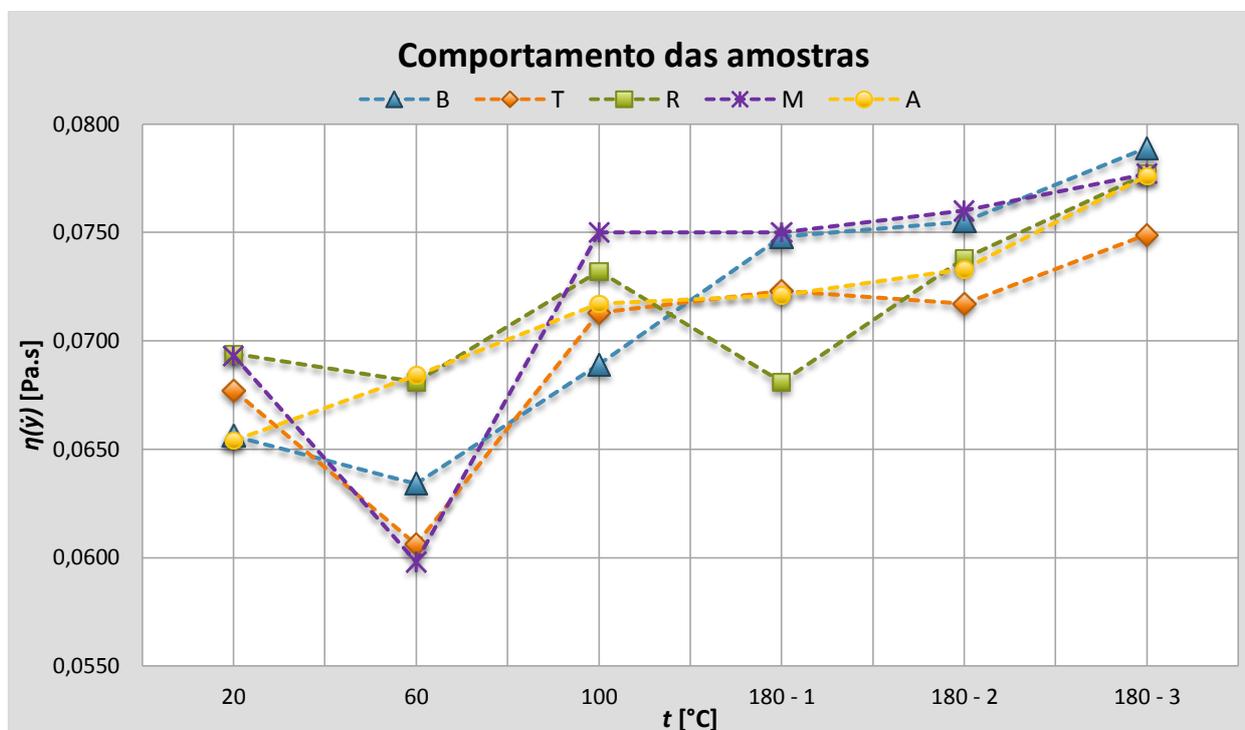


Figura 38 - Variação da viscosidade dinâmica das amostras de azeite em função das condições de processamento térmico

Para o azeite A, a viscosidade dinâmica aumenta com aquecimento, ou seja, o processamento térmico diminui a fluidez deste azeite. Após o processamento a 100°C não se verificam alterações acentuadas, com exceção do terceiro ciclo a 180°C, que possui o valor mais elevado de viscosidade dinâmica. A viscosidade mais baixa é obtida quando este azeite não é sujeito a tratamento térmico.

Após aquecer o azeite B a 60°C a sua viscosidade diminui, embora não de forma significativa, aumentando somente quando são aplicadas temperaturas superiores. Assim, a partir dos 100°C a viscosidade é superior à encontrada para as amostras sem aquecimento, com tendência a aumentar quando o azeite é sujeito a processamentos térmicos mais agressivos. No grupo das amostras sujeitas a

frituras não se realçam diferenças entre os dois primeiros ciclos, sendo observado o valor mais elevado de viscosidade dinâmica no terceiro ciclo.

Relativamente ao azeite T, a viscosidade varia em função do aquecimento. Isto é, este azeite ao ser submetido a 60°C e a 100°C, a sua viscosidade assume valores inferiores e superiores, respetivamente, quando comparada com os valores obtidos para amostras sem aquecimento. O grupo das frituras não apresenta variações bruscas na viscosidade mas no segundo ciclo observa-se um decréscimo e no terceiro ciclo um aumento acentuado. Deste modo, a viscosidade é mais baixa quando o azeite T é sujeito a 60°C e mais elevada após três ciclos a 180°C.

Por sua vez, a viscosidade diminui (mas não de forma significativa) quando o azeite R é sujeito a aquecimentos a 60°C, verificando-se o aumento desta propriedade para aquecimentos a 100°C. Alternadamente, aos 180°C a viscosidade toma valores novamente inferiores aos encontrados quando o azeite R não sofre aquecimento (20°C). Ainda aos 180°C, observa-se que o aumento do número de ciclos provoca o aumento quase linear da viscosidade. Para este azeite os valores da viscosidade não são muito distintos entre os diversos processamentos.

A viscosidade do azeite M diminui após processamento a 60°C, correspondendo aos menores valores desta propriedade. Comparando com os resultados obtidos para a ausência de processamento, a viscosidade das amostras aquecidas a 100°C é superior, não apresentando porém diferenças significativas entre os ciclos de fritura. Ao mesmo tempo, verifica-se um ligeiro aumento da viscosidade com o número de ciclos, atingindo o valor mais elevado no terceiro ciclo.

A análise estatística da viscosidade dinâmica inicial, correspondente a amostras sem aquecimento, permite dividir os azeites em dois grupos. Os azeites A e B exibem valores de viscosidade mais baixos (respetivamente 0,0654 e 0,0656 Pa.s) enquanto os valores mais elevados são encontrados nos azeites T, R e M (respetivamente 0,0677, 0,0694 e 0,0693 Pa.s). Esta distribuição deixa de existir com o aquecimento, revelando alterações na viscosidade. Assim, a variação da viscosidade com o processamento térmico adquire a ordem $R < A < T < B < M$.

Em resumo, quando as amostras são sujeitas a processamentos térmicos as suas propriedades estruturais são modificadas, conduzindo ao aumento da viscosidade. Não obstante, para determinadas amostras (azeites B, T, R e M) aos 60°C verifica-se uma diminuição da viscosidade, contrariamente ao esperado. Desta forma, as alterações encontradas aos 60°C diferem das verificadas nas outras temperaturas estudadas.

Parte dos resultados obtidos são concordantes com estudos descritos na literatura, sendo que a viscosidade aumenta com o aquecimento, nomeadamente durante a simulação de fritura (Benedito et al., 2002, Santos et al., 2005, Chatzilazarou et al., 2006, Sánchez-Gimeno et al., 2008, Kalogianni et al., 2011, Martinez-Pineda, 2011 e Carapinha et al., 2012). De acordo com Ashrafi, 2012, o aumento da temperatura pode envolver alterações microestruturais bem como da composição química dos azeites. Diversos autores referem ainda que a viscosidade dos óleos alimentares depende do grau de insaturação das cadeias de ácidos gordos e que durante o aquecimento ocorrem reações que são responsáveis pela diminuição do grau de insaturação (Abramovic e Klofutar, 1998, Kalogianni et al., 2011, Kim et al., 2010, Bonnet et al., 2011, Ashrafi, 2012, Dehghannejad et al., 2013 e Gila et al., 2014). Ainda assim, as alterações induzidas pelo processamento térmico, como as transformações no tamanho das

moléculas, são mais significativas na variação da viscosidade do que as provocadas pela saturação das ligações duplas dos triacilgliceróis (Kalogianni et al., 2011).

As variações observadas nos valores da viscosidade do azeite durante o aquecimento e nos repetidos ciclos de fritura têm sido atribuídas à formação de compostos (de diferentes dimensões moleculares) a partir dos triacilgliceróis como produtos de oxidação, polimerização, hidrólise e de fissão (Sánchez-Gimeno et al., 2008, Kalogianni et al., 2011, Martinez-Pineda, 2011, Ashrafi, 2012 e Carapinha et al., 2012). A oxidação promove a formação de hidroperóxidos, os quais, ao degradarem-se, conduzem ao aparecimento de álcoois, aldeídos e cetonas cujo desenvolvimento provoca a formação de ligações de hidrogénio que aumentam as forças intermoleculares, dificultando o fluxo entre as moléculas e, conseqüentemente, resultando no aumento da viscosidade (Santos et al., 2005 e Navarra et al., 2011). Relativamente à polimerização, o aumento do tamanho da cadeia de ácidos gordos conduz ao aumento do número de eletrões na molécula, aumentando as forças de London bem como as forças intermoleculares. Adicionalmente, as cadeias mais longas movem-se com maior dificuldade e conseqüentemente, resultam numa maior viscosidade (Santos et al., 2005, Sánchez-Gimeno et al., 2008 e Carapinha et al., 2012).

5.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Como referido anteriormente na secção 3.1.1.2., a determinação das propriedades em análise foi efetuada antes e após o aquecimento das amostras.

Para uma fácil e rápida leitura, os resultados, que correspondem à média dos triplicados, são apresentados sob a forma de tabelas e gráficos onde são comparados com os valores limite preconizados (representação gráfica do valor de referência mínimo a verde e do valor máximo a vermelho). É de referir que os valores de referência são aferidos apenas para amostras sem aquecimento.

5.2.1. DENSIDADE RELATIVA

Os azeites analisados são classificados como virgem extra, no entanto, não foram encontrados valores de referência para esta classificação. Assim, serão considerados os valores relativos a azeites virgens. De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, a densidade do azeite virgem deve estar compreendida entre 0,910 e 0,916 (à temperatura de 20°C, e por comparação com o valor da água à mesma temperatura).

Na Figura 39 estão representadas as variações da densidade relativa das amostras analisadas para cada processamento térmico.

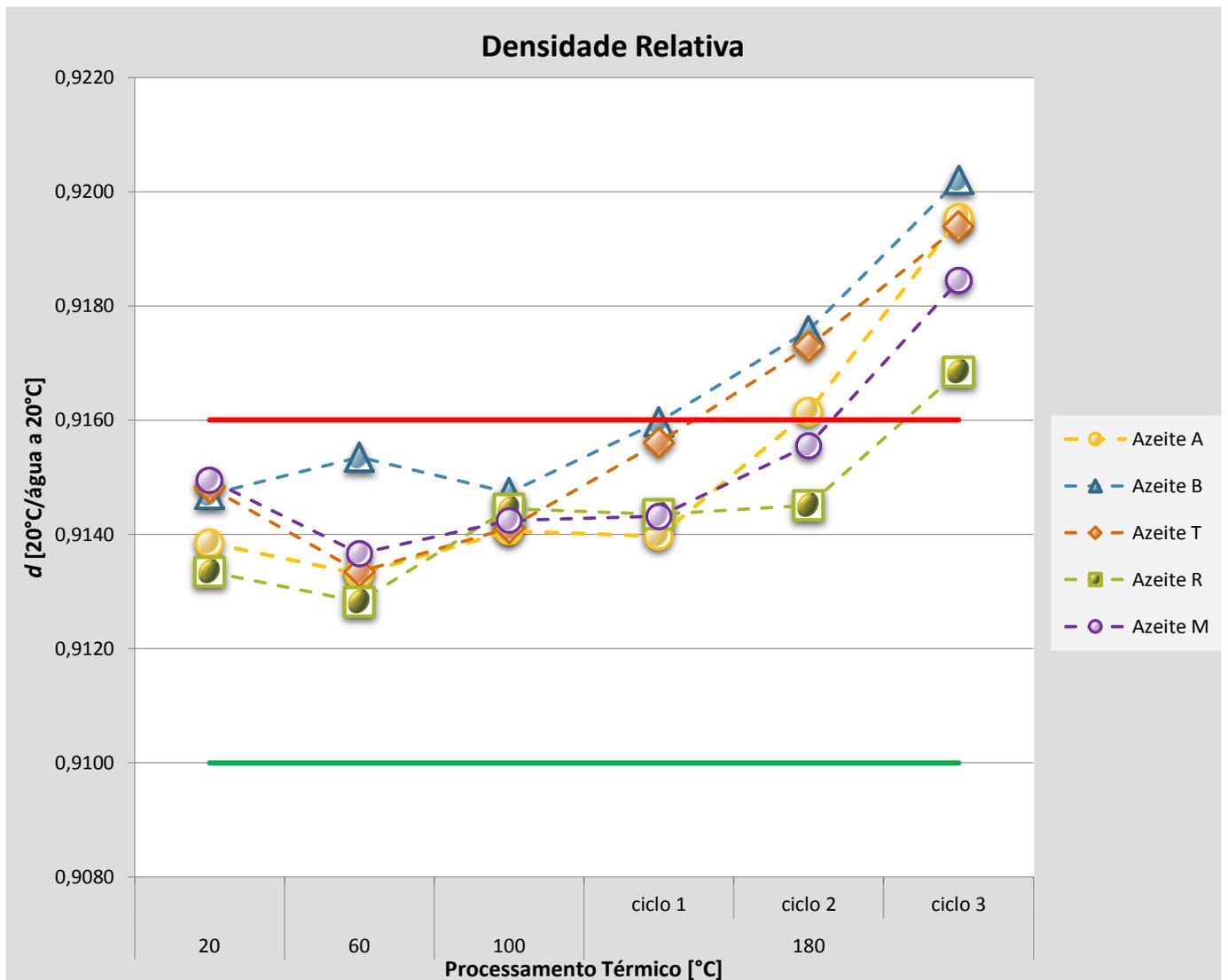


Figura 39 - Variação da densidade relativa com o processamento térmico para os azeites estudados

De um modo geral, a densidade relativa dos azeites à temperatura de 20°C ficou compreendida entre 0,9133 e 0,9150 20°C/água a 20°C, corroborando estudos anteriores (Benedito et al., 2002 e Gila et al., 2014) para a mesma temperatura.

Após aquecimentos moderados (temperaturas correspondentes a 60°C e a 100°C), verificam-se alterações nos valores de densidade relativa dos azeites analisados, embora sem importância estatística. Para a ausência de aquecimento e para processamentos a 60°C, 100°C e um ciclo a 180°C os valores de densidade encontram-se dentro dos limites estabelecidos. São visíveis diferenças significativas quando as amostras são sujeitas a processamentos repetidos a 180°C (dois e três ciclos), verificando-se um aumento sucessivo da sua densidade. Para estes processamentos a densidade relativa dos azeites excede o limite máximo definido (Figura 39).

Dos azeites considerados, a densidade relativa do azeite A é a que apresenta maior variação com o processamento térmico. Por sua vez, o azeite R é o que apresenta a menor variação da densidade relativa.

A densidade relativa determinada para a temperatura controlo bem como para aquecimentos de 100°C e 180°C não revela diferenças significativas entre os vários azeites analisados. Contudo, na maioria

dos azeites estudados verifica-se uma ligeira diminuição deste parâmetro quando as amostras são sujeitas a aquecimento prévio a 60°C, porém sem importância sob ponto de vista estatístico.

Em suma, as alterações na densidade relativa provocadas pelo processamento térmico moderado não são estatisticamente significativas. Não obstante, o aquecimento repetido a 180°C provocou alterações diferenciáveis, evidenciadas pelo aumento da densidade relativa.

Os resultados observados estão em conformidade com as conclusões referidas por Kalogianni et al., 2011 em que o aumento do processo de fritura (número de ciclos) conduziu ao aumento significativo da densidade. Kalogianni et al., 2011 sugerem que durante os processos de fritura e aquecimento ocorrem reações de oxidação, polimerização e isomerização, responsáveis pela formação de diversos produtos, de entre os quais compostos de elevada massa molecular comparativamente aos triacilgliceróis. Assim, a formação destes polímeros traduz-se no aumento da densidade dos óleos vegetais.

5.2.2. ÍNDICE DE REFRAÇÃO

De acordo com a sua natureza, os óleos e as gorduras desviam com diferente intensidade os raios luminosos que os atravessam. Como indicado na literatura, o índice de refração varia na razão inversa da temperatura e tende a aumentar com o grau de insaturação dos ácidos gordos constituintes dos triacilgliceróis (Oliveira et al., 2010, Melo e Pinheiro 2012 e Rios et al., 2013).

De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, os azeites virgens apresentam um índice de refração situado entre 1,4677 e 1,4705. Neste trabalho, foram obtidos valores de índice de refração apenas com 4 algarismos significativos devido à sensibilidade do refratómetro utilizado.

A Figura 40 permite observar que o índice de refração sofre grandes variações com os processamentos térmicos.

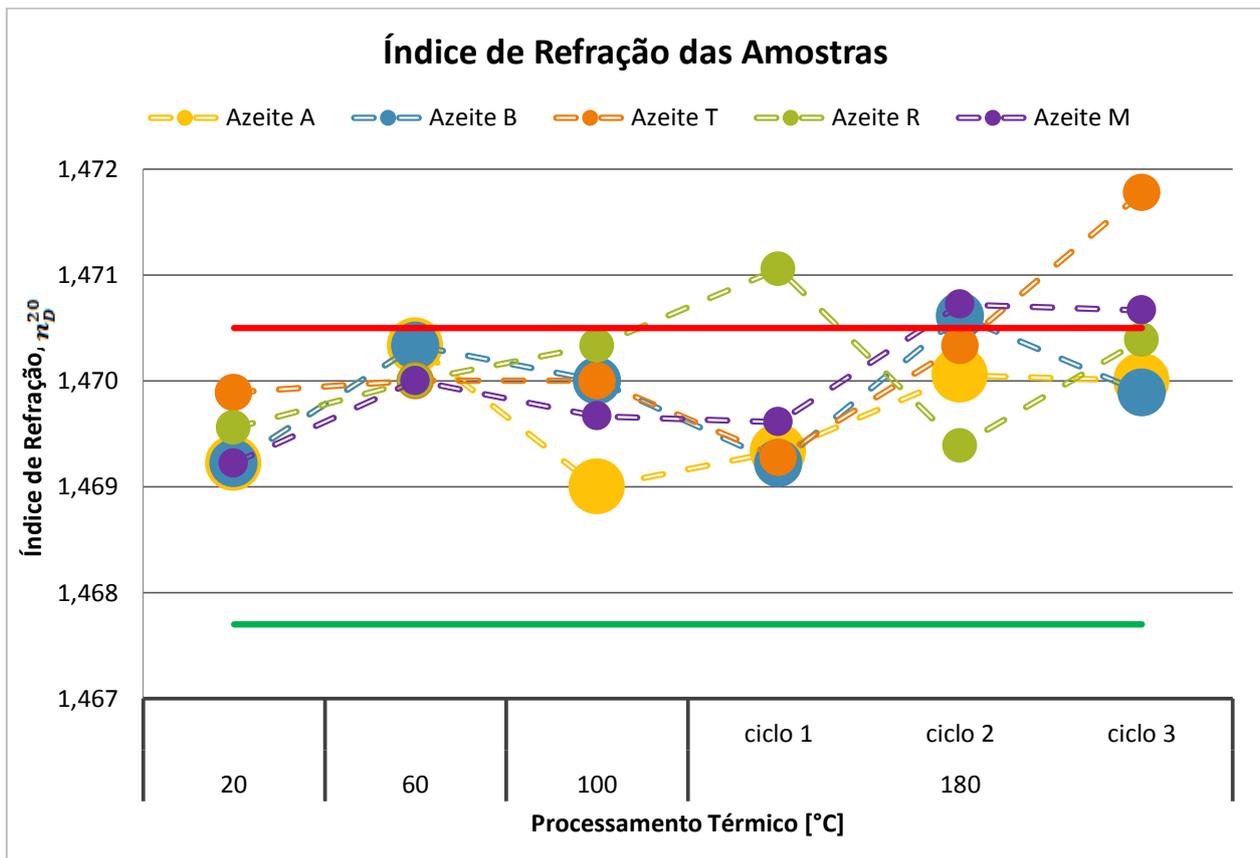


Figura 40 - Variação do índice de refração com o processamento térmico correspondente a todos os azeites estudados

Antes do aquecimento, os índices determinados encontram-se em conformidade com o Codex Alimentarius, 2001 e são semelhantes aos reportados por Oliveira et al., 2010 e Mello e Pinheiro, 2012. Após processamento à temperatura de 60°C as amostras exibem um aumento do índice de refração em relação à temperatura controlo (Figura 40), sendo que apresentam um comportamento bastante semelhante, evidenciado pela inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os azeites avaliados. Para os processamentos a 60°C e a 100°C, os índices de refração obtidos situam-se dentro dos valores indicados pelo Codex Alimentarius, 2001.

Na Figura 40 é ainda visível que no primeiro ciclo a 180°C o azeite R exhibe o maior índice de refração e o azeite B o menor. Porém não se registam diferenças consideráveis entre os restantes azeites. Neste processamento apenas o azeite R exhibe um índice que excede o limite superior.

No segundo ciclo a 180°C, o índice de refração aumenta para maioria das amostras analisadas, sendo que os azeites M e B apresentam índices superiores ao valor de referência máximo.

No último ciclo apenas os índices dos azeites T e M são superiores ao limite máximo.

De entre as amostras analisadas, o índice de refração apresenta maior variação para o azeite T e menor para o azeite A.

Face ao exposto, o índice de refração varia com o processamento térmico mas não é possível concluir, somente com este parâmetro, que estes azeites sofreram degradação. Esta variação pode dever-se à formação de produtos de oxidação decorrentes do aquecimento que alteram a composição do azeite e, conseqüentemente, a sua pureza avaliada por este índice. No entanto, a análise de correlação revela uma

relação significativa, embora muito fraca, entre o índice de refração e os coeficientes de extinção que avaliam o estado oxidativo do azeite (Tabela 24 (C)).

Adicionalmente, a teoria preconiza que a diminuição do índice de refração parece indicar a diminuição do grau de insaturação das amostras sujeitas a aquecimento, possivelmente relacionada com a formação de ácidos gordos saturados. Como referido na secção 5.2.5., os resultados referentes ao índice de iodo sugerem que o grau de insaturação das amostras diminui com o aquecimento, mas, neste trabalho, não foram encontradas correlações entre ambos os índices.

5.2.3. ÍNDICE DE ACIDEZ

A quantificação de ácidos gordos livres, resultantes principalmente da hidrólise dos triacilgliceróis, foi determinada por meio do índice de acidez (Casal et al., 2010). Um elevado valor deste índice remete para um também elevado número de ácidos gordos livres.

O Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro preconiza, para o índice de acidez, valores inferiores ou iguais a 0,8 (% ácido oleico) na categoria de azeites virgens extra.

Os resultados referentes ao índice de acidez estão representados graficamente na Figura 41.

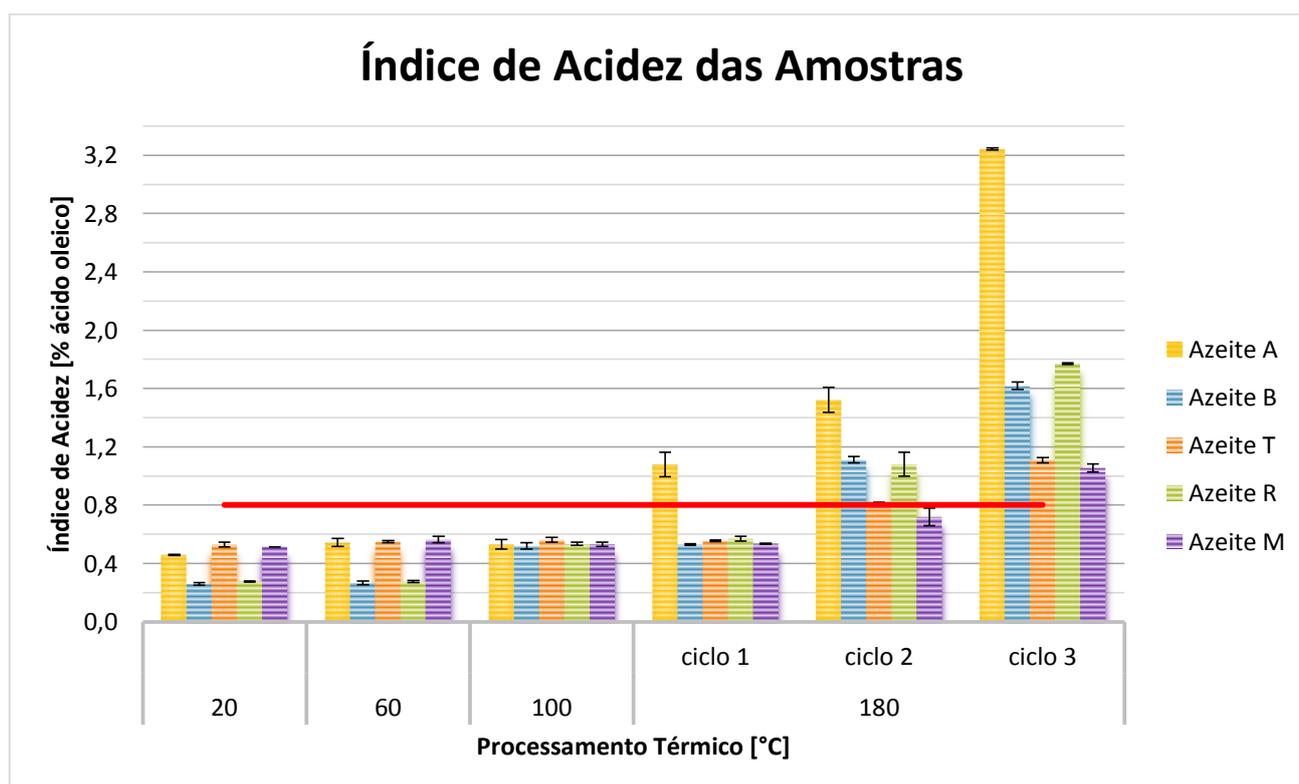


Figura 41 - Variação do índice de acidez com o processamento térmico para todos os azeites estudados

A análise dos resultados permite constatar:

- (i) Na ausência de aquecimento, os azeites estudados apresentam índices de acidez inferiores aos preconizados, confirmando a boa qualidade da matéria-prima e conservação do produto, entre outros. Os valores determinados para este índice antes do aquecimento estão de acordo com os reportados por Casal et al., 2010, Oliveira et al., 2010 e Mello e Pinheiro, 2012;

- (ii) Após aquecimentos a 60°C e a 100°C, o índice de acidez dos azeites continua de acordo com a legislação uma vez que apresenta valores inferiores ao limite estipulado para os azeites virgens extra;
- (iii) O tratamento térmico conduziu à libertação de ácidos gordos e conseqüentemente, ao aumento do índice de acidez, embora estas alterações sejam pouco significativas para os processamentos moderados. Este aumento do índice de acidez é mais notável no processamento por frituras, uma vez que aumenta significativamente com o número de ciclos de fritura;
- (iv) No primeiro ciclo a 180°C, o azeite A apresenta uma maior quantidade de ácidos gordos livres, com valores superiores ao limite de referência. Os restantes azeites não apresentam diferenças significativas entre si;
- (v) No segundo ciclo a 180°C, os azeites M e T ainda apresentam valores inferiores ao limite, sendo os restantes classificados como azeites virgens (Tabela 1);
- (vi) No terceiro ciclo a 180°C todos os azeites apresentam índices de acidez superiores aos preconizados para a classificação virgem extra. Podemos pois classificar o Azeite A como azeite lampante e os restantes como azeites virgens (Tabela 1);
- (vii) O índice de acidez variou mais no azeite A e menos no azeite M, sugerindo que azeites monovarietais são mais suscetíveis à degradação.

Os resultados apresentados corroboram as conclusões mencionadas por Casal et al., 2010 e Carapinha et al., 2012. Do mesmo modo, Bester et al., 2008 verificou que o aquecimento prolongado a 100°C resultou no aumento do índice de acidez. Diversos autores sugerem que o motivo para este aumento prende-se possivelmente com a formação de compostos de oxidação secundários, designadamente ácidos carboxílicos voláteis, que libertam iões de hidrogénio e por conseguinte tornam o azeite mais ácido (Bester et al., 2008 e Carapinha et al., 2012).

Uma vez que os ácidos gordos são constituintes do azeite, uma quantidade elevada destes compostos na forma livre sugere que o produto está em processo de deterioração. No entanto, considerando que os limites referentes à categoria de azeites virgens preconizam uma percentagem de ácido oleico inferior ou igual a 2, os resultados determinados no presente estudo atenderam a esta faixa especificada pela legislação mesmo após aquecimento. A exceção encontra-se no azeite A, quando sujeito a três ciclos a 180°C (Figura 41). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que os azeites virgem extra sofrem alterações no índice de acidez após aquecimento, mas não se verifica acentuada degradação da sua qualidade, continuando adequados para a utilização culinária.

Por outro lado, embora a qualidade ainda possa ser boa, cumprindo os requisitos legais para os azeites virgem extra, a quantidade de componentes minoritários responsáveis pelos atributos sensoriais e pelos potenciais benefícios para a saúde poderá ter diminuído significativamente.

5.2.4. ÍNDICE DE BELLIER

Uma vez que não foram encontrados valores de referência para azeites virgens extra, foram utilizados os valores respeitantes à categoria de azeites virgem. O Codex Alimentarius, 2001 indica que o índice de Bellier do azeite virgem deve ser inferior a 17°C.

Na Figura 42 estão demonstradas as alterações do índice de Bellier para todas as amostras.

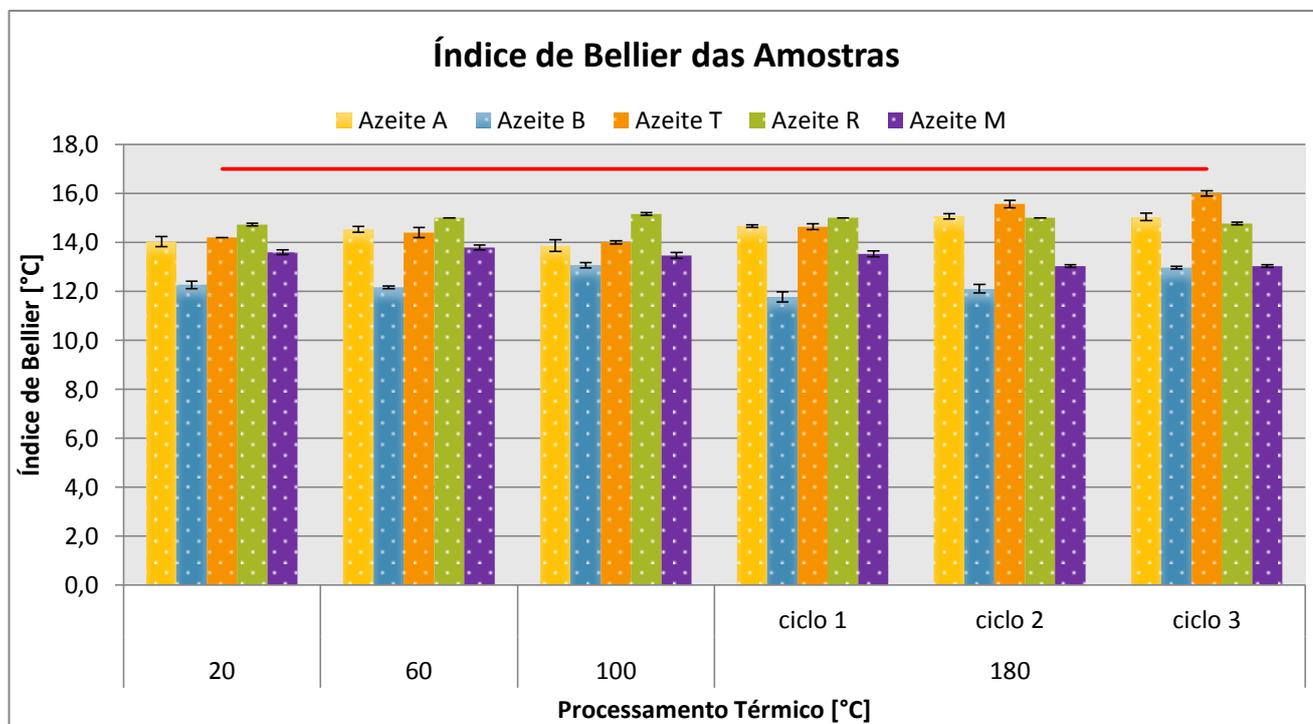


Figura 42 - Variação do índice de Bellier com o processamento térmico para todos os azeites estudados

De um modo geral, quando as amostras não sofrem tratamentos térmicos, a temperatura de turvação varia entre os 12°C e os 15°C, sendo que o azeite R possui o valor mais elevado do índice de Bellier enquanto o azeite B possui o menor índice. Os azeites A e T apresentam índices com valores muito semelhantes. O mesmo padrão é encontrado para os processamentos térmicos a 60°C e 100°C, bem como para o primeiro ciclo a 180°C. Relativamente ao segundo e ao último ciclo a 180°C, o azeite B continua a apresentar o menor valor deste índice enquanto o valor mais elevado é observado para o azeite T (Figura 42).

O índice de Bellier do azeite R apresenta a menor variação e o azeite T mostra a maior alteração.

Em suma, os azeites em estudo não apresentaram alterações significativas nos respetivos índices de Bellier ao longo dos processos de aquecimento.

O índice de Bellier é utilizado para averiguar a adulteração do azeite com outros óleos vegetais, não tendo interesse avaliá-lo após aquecimento. De qualquer modo, nas amostras analisadas, este parâmetro situa-se dentro da faixa característica para azeites virgens, independentemente dos tratamentos térmicos a que foram sujeitas (Figura 42).

5.2.5. ÍNDICE DE IODO

O índice de iodo permite determinar o grau de insaturação do azeite, sendo influenciado pela composição do óleo vegetal.

De acordo com Codex Alimentarius, 2001, o índice de iodo de azeites virgens, expresso sob a forma de percentagem de iodo absorvido, deve estar compreendido entre 75% e 94%.

A Figura 43 reúne as informações sobre o índice de iodo antes e após aquecimento. Os valores obtidos para a temperatura controlo são semelhantes aos encontrados nos estudos efetuados por Cardoso et al., 2010, Oliveira et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012 e Rios et al., 2013.

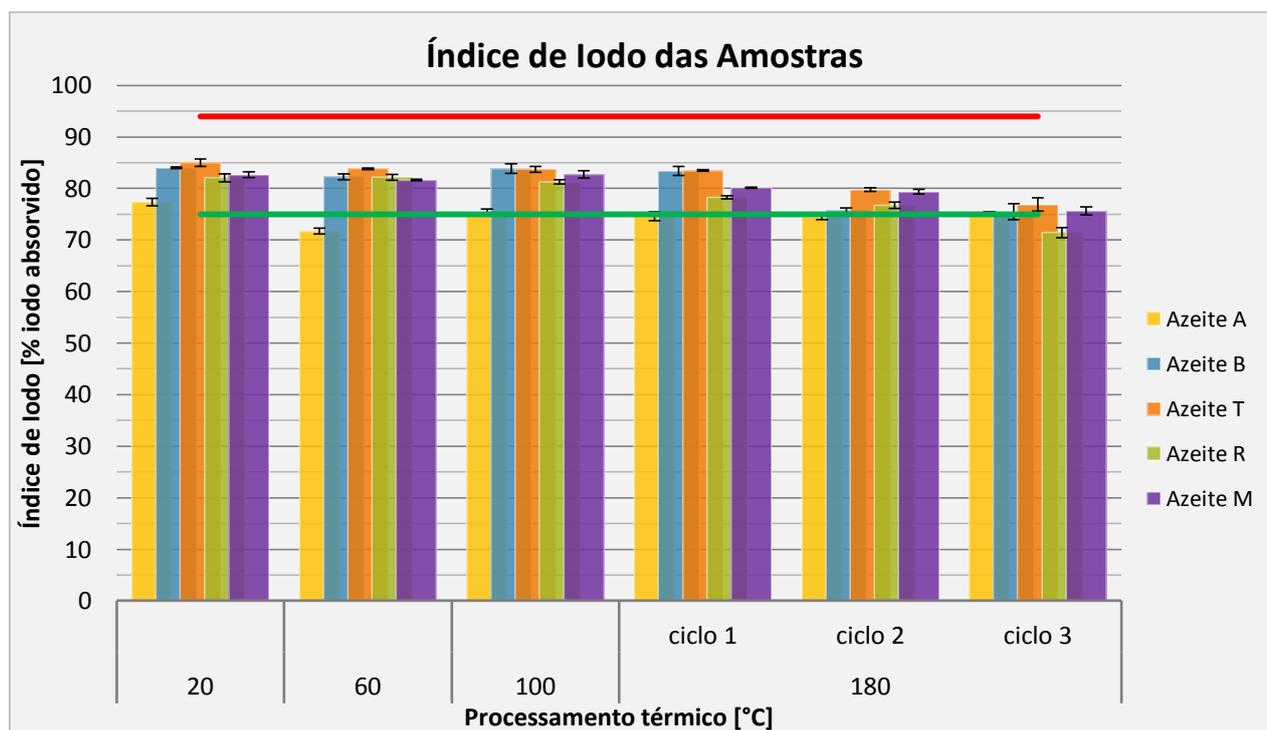


Figura 43 - Variação do índice de iodo com o processamento térmico para todos os azeites estudados

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 43 mostram:

- (i) O número inicial de ligações duplas dos ácidos gordos determinado pelo índice de iodo permite distinguir parcialmente os azeites analisados, sendo, por ordem crescente, $A < R < M < B < T$. Os azeites M e R apresentam um grau de insaturação semelhante;
- (ii) De um modo geral, os azeites estudados apresentam valores de índice de iodo inferiores ao limite máximo proposto para azeites virgens, mesmo após aquecimento. Apenas no terceiro ciclo a 180°C se obtêm valores no limiar ou inferiores ao limite mínimo considerado, sugerindo que os azeites são adequados para utilizar como meio de fritura;
- (iii) O azeite A é o que apresenta a menor variação do índice de iodo provocada pelos processamentos térmicos. Em contraste, o índice de iodo do azeite R é o que mais varia;
- (iv) O processamento térmico provoca alterações no grau de insaturação dos ácidos gordos constituintes das amostras, verificando-se uma diminuição do índice de iodo. No entanto, estas alterações são apenas estatisticamente significativas para os processos de fritura;

Estes resultados sugerem que o processamento térmico, designadamente a fritura, modifica a composição de ácidos gordos, com a formação de ácidos gordos saturados e/ou através da diminuição dos ácidos gordos insaturados. Segundo Martinez-Pineda, 2011, Rios et al., 2013 e Martínez-Yusta e Guillén, 2014, o índice de iodo diminui em óleos sujeitos a fritura como consequência da quebra das ligações duplas bem como do desaparecimento do grupo acilo das ligações duplas devido a reações de polimerização e oxidação. Assim, os azeites devem apresentar um índice de iodo elevado pois é indicador da presença de ácidos gordos insaturados mais benéficos para a saúde do que os saturados, visto que um maior nível de saturação está relacionado com a maior formação de compostos tóxicos (DRAP Centro, 2002).

Os resultados verificados sugerem que os azeites virgem extra analisados são adequados à utilização em processos culinários.

5.2.6. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O índice de peróxidos expressa o estado de oxidação inicial do azeite e a sua rancificação, bem como a possível deterioração que certos componentes de interesse nutricional, como os antioxidantes naturais, possam ter sofrido (Cardoso et al., 2010, Mello e Pinheiro, 2012 e Casa do Azeite, 2014).

O Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro preconiza que este índice seja inferior ou igual a 20 mEq O₂/kg para a categoria de azeites virgens extra.

Na Figura 44 estão representados os índices de peróxidos determinados para cada azeite antes e após aquecimento.

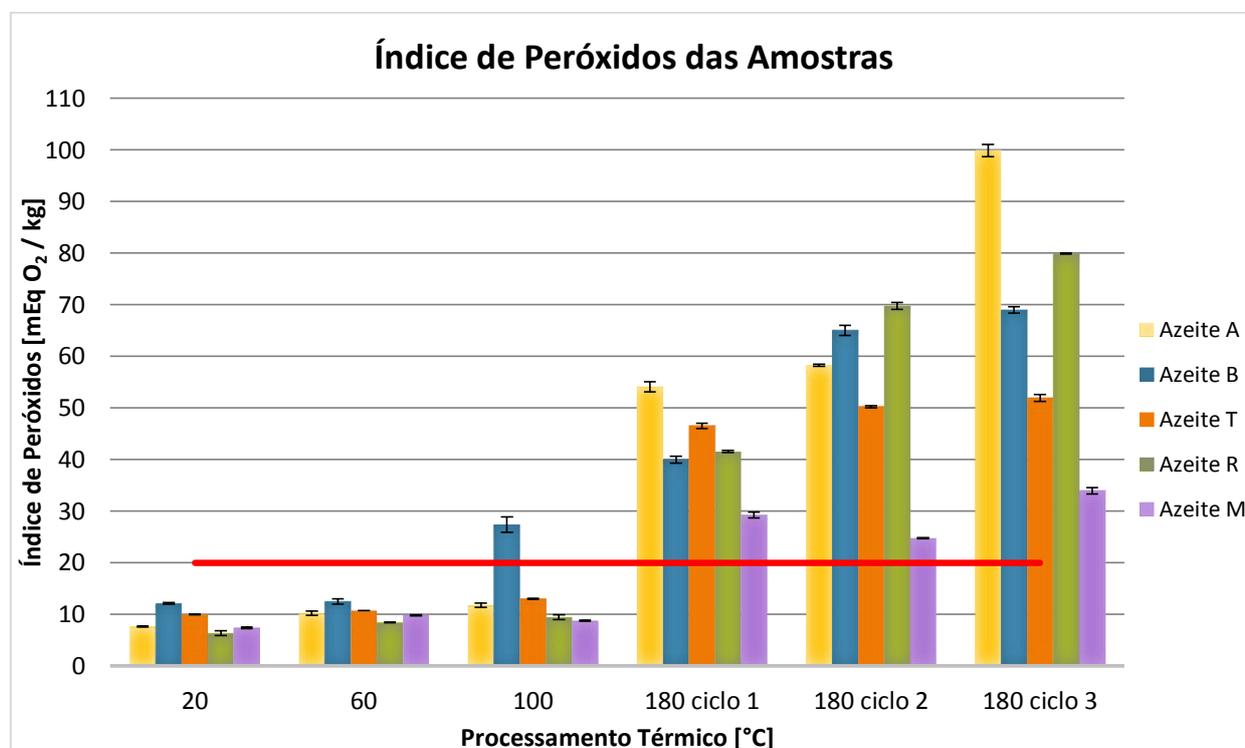


Figura 44 – Representação gráfica da variação do índice de peróxidos com o processamento térmico para todos os azeites estudados

A análise da Figura 44 permite inferir que o índice de peróxidos dos azeites aumenta significativamente com o aquecimento. Contudo, em determinadas amostras, como o azeite B e T, não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras sem aquecimento e as amostras sujeitas a processamentos a 60°C.

Na ausência de aquecimento os vários azeites possuem um índice de peróxidos estatisticamente diferente, salvo os índices dos azeites M e A que são semelhantes. O índice determinado para o segundo ciclo de frituras permite distinguir as amostras de uma forma mais expressiva, sendo o azeite M o que apresenta o menor valor deste índice, e o azeite R tem o maior valor. O mesmo acontece no terceiro ciclo, sendo o índice do azeite M o de menor valor e o azeite A possui um índice de peróxidos bastante elevado.

Das amostras analisadas, a maior variação do índice de peróxidos com os processamentos térmicos é encontrada para o azeite A e a menor variação pertence ao azeite T, sugerindo que azeites monovarietais são mais suscetíveis à degradação.

A título exemplificativo refere-se o azeite T, que não apresenta diferenças significativas quando não é sujeito a aquecimento e após processamento a 60°C, mostrando um índice equivalente a 10 mEq O₂/kg. No entanto, verifica-se um aumento estatisticamente significativo deste parâmetro quando o azeite é submetido a processamentos de 100°C e um aumento muito acentuado após processamentos a 180°C.

O índice de peróxidos para a maioria das amostras excede o valor regulamentado apenas quando são sujeitas a processamentos térmicos mais agressivos, nomeadamente após 180°C. Relativamente ao azeite B, observa-se que apresenta um índice superior ao limite máximo preconizado para azeites virgens extra após aquecimento a 100°C e sucessivos processamentos.

De um modo geral, os resultados permitem constatar que o processamento térmico para temperaturas cada vez mais elevadas provoca o aumento da concentração de hidroperóxidos e, conseqüentemente, o aumento do índice de peróxidos. Este facto é mais visível nas frituras, sugerindo que este processamento conduz à formação de compostos tóxicos que agrava quando o azeite é reutilizado. Os resultados obtidos corroboram os encontrados por Chatzilazarou et al., 2006, Bester et al., 2008 e Casal et al., 2010. No entanto, alguns autores verificaram que nos ensaios de fritura o índice de peróxidos atingiu um valor máximo a que se seguiu um decréscimo (Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Martinez-Pineda, 2011 e Carapinha et al., 2012). Este comportamento deve-se ao facto de na fase inicial de oxidação ocorrer apenas a formação de hidroperóxidos conjugados. Todavia, no progresso desta reação, os hidroperóxidos decompõem-se em moléculas de menor massa molecular, algumas delas voláteis e responsáveis pelo cheiro a ranço (aldeídos, cetonas e ácidos gordos de cadeia curta). Nestes estudos foram utilizados azeites virgens extra como meio de fritura de alimentos. O estudo de Martinez-Pineda, 2011 teve como âmbito avaliar o efeito do aquecimento e dos processos de fritura (a 190°C por períodos de 8h/dia durante 4 dias) na composição do meio de fritura (azeite virgem extra), bem como clarificar a influência dos alimentos (donut, banha e filetes de salmão) na evolução da composição do meio de fritura. Por sua vez, Carapinha et al., 2012 pretendeu avaliar também a qualidade de dois azeites comerciais (azeite virgem extra e azeite) durante os processos de aquecimento (a 180±2°C por um período de 63 horas) e de fritura de batatas fritas congeladas.

É importante referir a existência de autores que discordam da aplicação do índice de peróxidos como meio de avaliação da deterioração de óleos usados para fritura uma vez que sob condições agressivas a

taxa de decomposição de peróxidos é superior à sua taxa de formação (Pokorny et al., 2001, Sanibal e Mancini-Filho, 2002, Rios 2006, Bester et al., 2008, Casal et al., 2010 e Martinez-Pineda, 2011). Os hidroperóxidos são instáveis e são rapidamente fracionados em moléculas menores, originando produtos voláteis e não voláteis, principalmente em temperaturas superiores a 150°C. Mesmo a temperaturas de 80°C a 90°C a formação de hidroperóxidos é acompanhada pela sua decomposição a uma velocidade significativa (Pokorny et al., 2001, Chatzilazarou et al., 2006 e Rios et al., 2013).

Portanto, o índice de peróxidos deve ser combinado com um método de monitorização de produtos secundários de oxidação, designadamente aldeídos que são mais estáveis, para proporcionar informações mais adequadas sobre o progresso da oxidação. Como exemplo refere-se a determinação do valor de *p*-anisidina. Este último estima a quantidade de aldeídos formados a partir da oxidação secundária dos lípidos presentes no azeite (Pokorny et al., 2001, Bester et al., 2008 e Casal et al., 2010).

5.2.7. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

O índice de saponificação fornece informações referentes ao comprimento da cadeia de ácidos gordos, sendo que os ácidos gordos de menor peso molecular requerem maior quantidade de solução alcalina para a saponificação e, conseqüentemente, apresentam um índice elevado (Cardoso et al., 2010 e Mello e Pinheiro, 2012).

Mais uma vez, não foram encontrados valores de referência para este índice na legislação portuguesa. De acordo com o Codex Alimentarius, 2001, o índice de saponificação, expresso em mg KOH/g óleo, apresenta como limites mínimo e máximo valores de 184 mg e 196 mg, respetivamente. Estes valores de referência são relativos à classificação de azeites virgem.

A Figura 45 reúne as informações sobre a variação do índice de saponificação das amostras antes e após aquecimento.

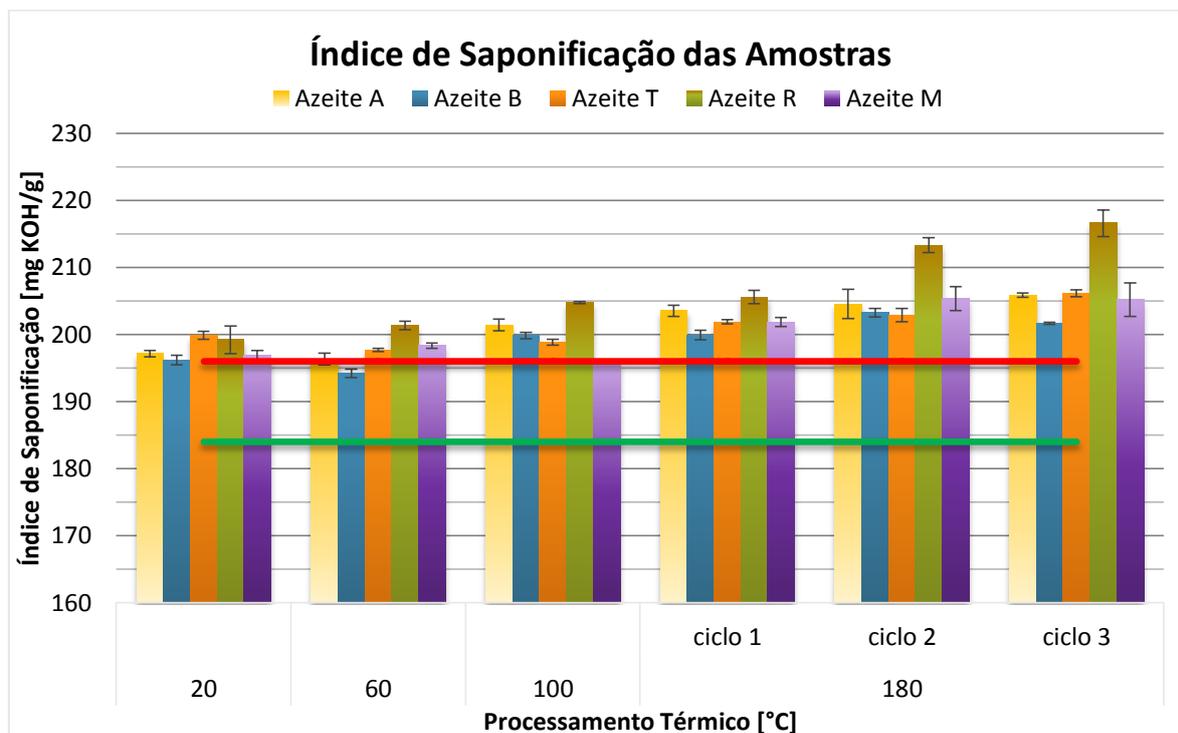


Figura 45 - Variação do índice de saponificação com o processamento térmico para todos os azeites estudados

A análise da Figura 45 permite constatar que as amostras exibem índices de saponificação superiores aos valores de referência máximos descritos no Codex Alimentarius, 2001. Não é incomum os valores dos índices de saponificação serem superiores aos estipulados e o motivo parece estar relacionado com o solvente utilizado na extração ou com a temperatura da reação (a frio ou a quente), como refere Cardoso et al., 2010.

Apesar das variações encontradas, os resultados obtidos sugerem que o processamento térmico provoca o aumento do índice de saponificação, nomeadamente quando os azeites são sujeitos a processamentos mais agressivos (várias repetições a 180°C). Estes resultados parecem indicar que o aquecimento leva à diminuição do comprimento das cadeias de ácidos gordos bem como à diminuição do seu peso.

Paralelamente ao índice de saponificação, o índice de acidez aumenta com os processamentos térmicos. A correlação existente entre ambos os índices (secção 5.4.2.) sugere que a diminuição do tamanho e peso das cadeias de ácidos gordos associa-se à formação de ácidos gordos livres, de menor tamanho molecular e por isso, o índice de saponificação aumenta com o aquecimento.

O azeite R regista o maior aumento do índice de saponificação, enquanto o índice de saponificação do azeite T variou menos.

5.2.8. COEFICIENTES DE EXTINÇÃO

A extinção específica (K) de um azeite a 232 nm e 270 nm reflete o seu grau de oxidação. Os produtos de oxidação como hidroperóxidos e dienos conjugados têm absorção máxima a aproximadamente 232 nm enquanto os produtos secundários de oxidação (aldeídos e cetonas) e trienos conjugados (produtos primários de oxidação do ácido α -linolénico) absorvem na gama dos 260 a 272 nm (Codex Alimentarius, 2001, Quiles et al., 2002, Bester et al., 2008, Casal et al., 2010, Carapinha et al., 2012 e Mello e Pinheiro, 2012).

O aumento da variação do valor absoluto da extinção específica (ΔK) é também um parâmetro importante uma vez que reflete o aumento do estado de oxidação das amostras (Capannesi et al., 2000).

Os limites destes parâmetros espectrofotométricos referentes a azeites virgens extra estão presentes no Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro. Este indica que os valores de K_{270} , K_{232} e ΔK têm de ser inferiores ou iguais a 0,22, 2,50 e 0,01, respetivamente.

As Figuras 46 a 50 mostram a evolução destes parâmetros com o aumento das temperaturas aplicadas às amostras em análise.

Azeite A

A Figura 46 reúne os resultados dos coeficientes de extinção para as amostras A nas condições de processamento em estudo.

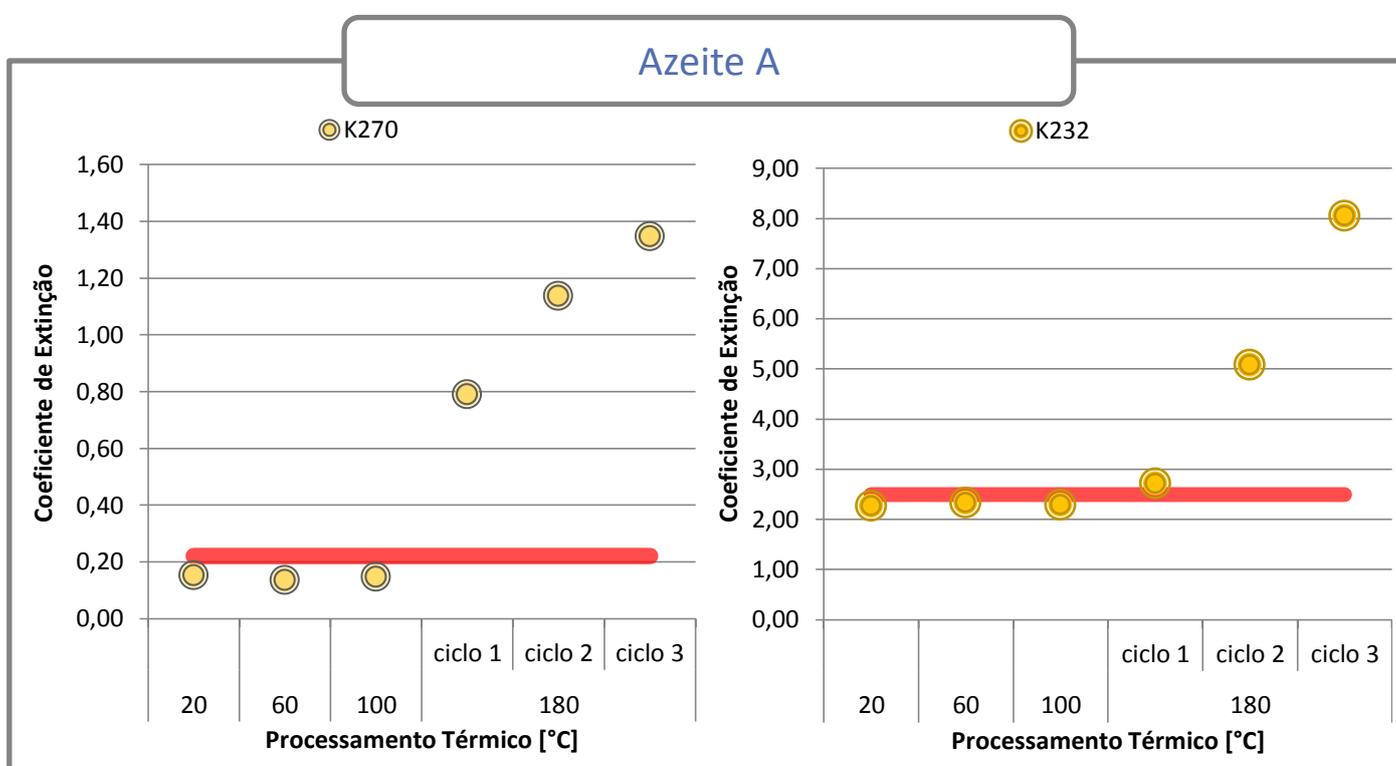


Figura 46 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite A

Considerando a temperatura controlo, o coeficiente de extinção a 270 nm (K_{270}) não se altera significativamente após aquecimento a 100°C mas, diminui ligeiramente após o aquecimento a 60°C. Nos ciclos a 180°C verifica-se um aumento quase linear do K_{270} com o número de repetições.

As amostras que não sofreram aquecimento e as amostras sujeitas a processamentos moderados exibem valores de K_{270} inferiores ao limite máximo preconizado para a categoria virgem extra. Por outro lado, o K_{270} das amostras pertencentes ao grupo das frituras excede o mesmo limite. Não obstante, o azeite A após ser submetido a dois e três ciclos de frituras apresenta valores de K_{270} adequados à categoria de óleo de bagaço de azeitona, bem como de óleo de bagaço de azeitona refinado (Tabela 1).

Analisando novamente a Figura 46, o K_{232} não apresenta variações acentuadas para as primeiras temperaturas representadas (20°C, 60°C e 100°C), registrando-se apenas um ligeiro aumento. No grupo dos processamentos a 180°C o K_{232} aumenta de forma aproximadamente linear com o número de ciclos. Apenas este grupo excede o limite regulamentado.

Tabela 14 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite A

t [°C]	20	60	100	180 ciclo 1	180 ciclo 2	180 ciclo 3
$\Delta K \pm$	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,05
$\sigma(\Delta K)$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$

A Tabela 14 revela que o parâmetro ΔK tende a aumentar com o processamento térmico e que o aquecimento a 180°C conduz a valores superiores ao limite preconizado.

Azeite B

O K_{270} das amostras de azeite B sem aquecimento e das amostras aquecidas a 60°C não difere significativamente (Figura 47). Para os processamentos a 100°C regista-se uma diminuição deste coeficiente, embora aumente consideravelmente nas amostras sujeitas a processamentos a 180°C. Neste último grupo, o aumento é sucessivamente maior de acordo com o crescente número de ciclos.

O K_{270} deste azeite para as três primeiras temperaturas representadas é inferior ao limite máximo preconizado, embora este seja excedido após processamentos a 180°C. Contudo, mesmo nas condições em estudo mais agressivas este azeite exibe valores que se situam no limiar dos valores preconizados para óleos de bagaço de azeitona refinados (Tabela 1).

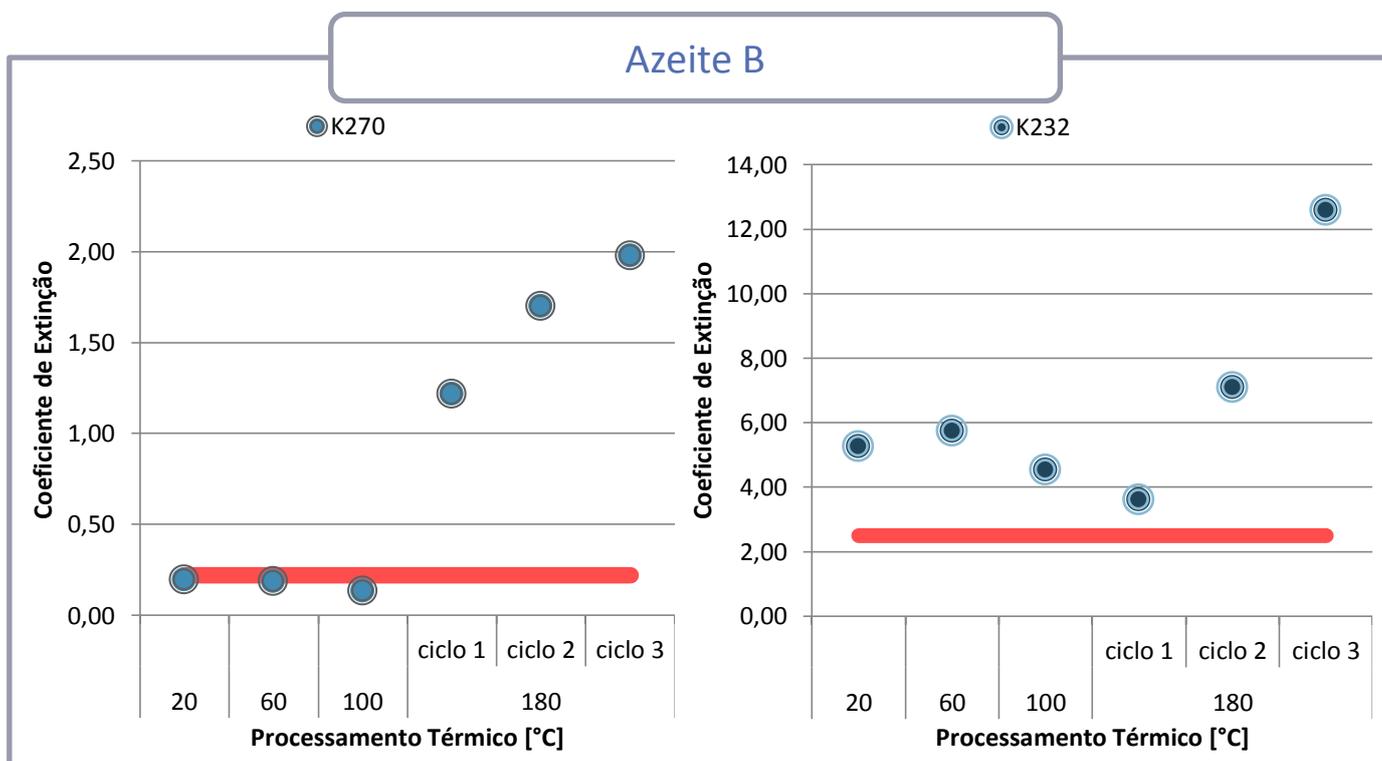


Figura 47 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite B

Relativamente ao K_{232} , a Figura 47 mostra que os resultados obtidos não se encontram de acordo com o limite estabelecido para azeites virgens extra.

Os resultados do K_{232} sugerem que o azeite B possui um grande número de produtos de oxidação mesmo antes do seu aquecimento. Isto revela que o azeite talvez poderá ter sofrido transformações antes de ser submetido aos processamentos térmicos. Todavia, o K_{270} apresenta valores adequados para a temperatura controlo, sugerindo que a eventual degradação não foi muito extensa uma vez que o azeite B não possui produtos secundários de oxidação significativos nessa temperatura.

Tabela 15 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite B

t [°C]	20	60	100	180 ciclo 1	180 ciclo 2	180 ciclo 3
$\Delta K \pm$	0,00	0,01	0,03	0,02	0,07	0,03
$\sigma(\Delta K)$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$

A Tabela 15 mostra que para processamentos superiores a 60°C o ΔK é superior aos valores de referência.

Azeite T

Analisando a Figura 48, o K_{270} do azeite T está de acordo com a legislação em vigor quando o azeite não é sujeito a processamentos mas, para processamentos térmicos superiores a 60°C excede o limite estabelecido.

Os parâmetros K_{270} e K_{232} aumentam após processamentos térmicos, sendo este aumento mais notável no grupo dos 180°C. Contudo, o valor de K_{232} das amostras aquecidas previamente a 100°C é superior ao valor determinado para as amostras sujeitas a um ciclo a 180°C, contrariamente ao expectável.

Em ambos os coeficientes de extinção, os processamentos térmicos diferem significativamente entre si, reforçando que o aquecimento provoca o aumento destes parâmetros.

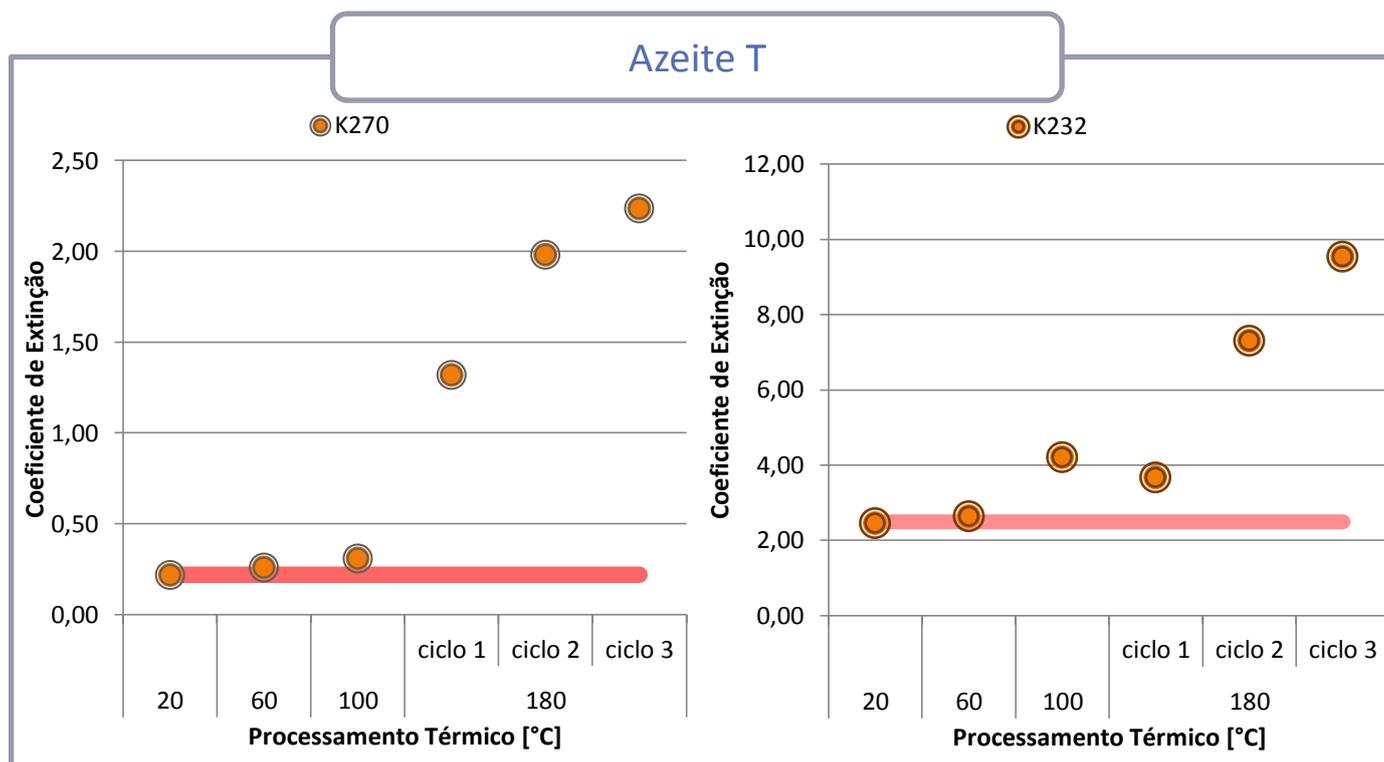


Figura 48 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite T

A Tabela 16 permite verificar que, para os processamentos moderados, o azeite T possui valores concordantes com a gama de valores aplicados. Assim, os maiores valores de ΔK são encontrados apenas para aquecimentos a temperaturas elevadas.

Tabela 16 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite T

t [°C]	20	60	100	180 ciclo 1	180 ciclo 2	180 ciclo 3
$\Delta K \pm$	0,01	0,01	0,00	0,10	0,08	0,08
$\sigma(\Delta K)$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$

Azeite R

Na Figura 49, referente ao azeite R, observa-se que após aquecimento a 60°C o valor de K_{270} é superior ao determinado para as amostras sem aquecimento e situa-se ligeiramente acima do limite regulamentado. Não se verificam diferenças significativas neste coeficiente entre as amostras sem aquecimento e as amostras sujeitas a processamentos a 100°C. É também visível que após aquecimento a 180°C o K_{270} é elevado. O aumento do número de ciclos de fritura é responsável pelo aumento deste coeficiente. Para estas temperaturas os valores determinados são superiores aos indicados no Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro para azeites virgens extra, mas encontram-se adequados para a categoria de óleo de bagaço de azeitona (Tabela 1).

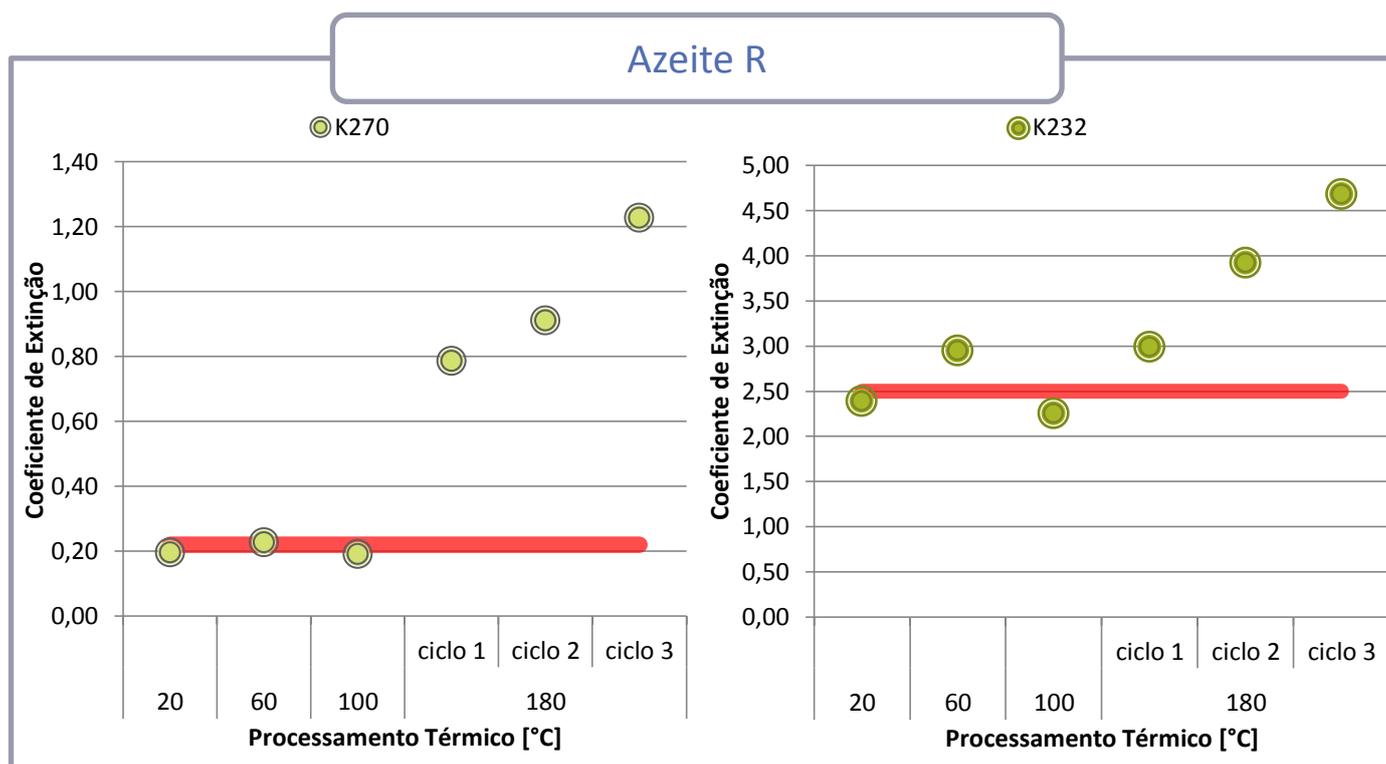


Figura 49 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite R

Relativamente ao K_{232} , os seus valores diversificam-se (Figura 49). As amostras encontram-se em conformidade com o valor preconizado apenas na ausência de processamento e no aquecimento a 100°C. Nos restantes processamentos o K_{232} assume valores superiores ao limite máximo preconizado.

Para o grupo das frituras o aumento deste coeficiente ocorre de forma aproximadamente linear com o número de repetições a 180°C.

Tabela 17 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite R

t [°C]	20	60	100	180 ciclo 1	180 ciclo 2	180 ciclo 3
$\Delta K \pm$	0,00	0,01	0,02	0,04	0,05	0,05
$\sigma(\Delta K)$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$

A análise da Tabela 17 permite concluir que o aumento do ΔK advém do aumento da degradação térmica. Adicionalmente, os valores determinados para os processamentos mais agressivos bem como para aquecimentos a 100°C são superiores ao limite preconizado.

Azeite M

Relativamente ao azeite M, o parâmetro K_{270} aumenta significativamente com os processamentos térmicos aplicados (Figura 50). As amostras sujeitas a processamentos térmicos a 60°C e a 100°C não diferem significativamente entre si, sendo que o K_{270} situa-se no limite preconizado. Para os tratamentos

a temperaturas mais elevadas verifica-se um aumento considerável do K_{270} em relação a amostras sem aquecimento, atingindo valores superiores aos valores de referência para azeites virgem extra. Não obstante, nestas condições os valores de K_{270} são inferiores ao limite proposto para a categoria de óleo de bagaço de azeitona (Tabela 1).

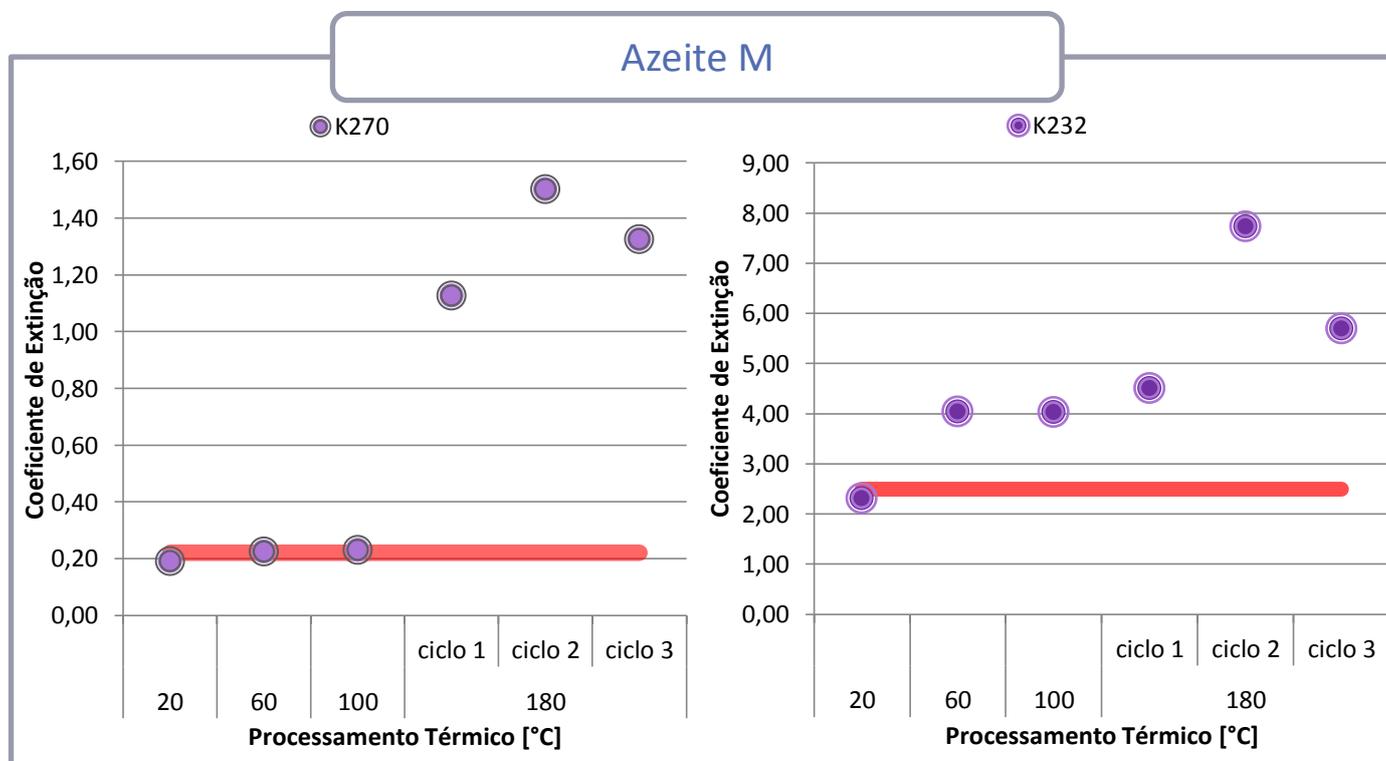


Figura 50 - Variação dos coeficientes de extinção com o processamento térmico para o azeite M

Por último, os valores de K_{232} excedem o limite preconizado quando este azeite é sujeito a aquecimento (Figura 50). Além disso, verifica-se que esse aumento é mais acentuado após tratamentos a 180°C. Não se verificam diferenças significativas entre os processamentos térmicos moderados (60°C e 100°C).

Tabela 18 - Variação da extinção específica com o processamento térmico para o azeite M

t [°C]	20	60	100	180 ciclo 1	180 ciclo 2	180 ciclo 3
$\Delta K \pm$	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07	0,04
$\sigma(\Delta K)$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$

O parâmetro ΔK encontra-se dentro dos limites estabelecidos, mesmo quando o azeite é submetido a temperaturas de 60°C e de 100°C. O mesmo não se verifica para temperaturas mais elevadas em que o ΔK excede o limite máximo (Tabela 18).

Efeito do Processamento Térmico

As Figuras 51 e 52 permitem comparar os resultados determinados para cada amostra relativamente aos coeficientes de extinção a 232 nm e a 270 nm.

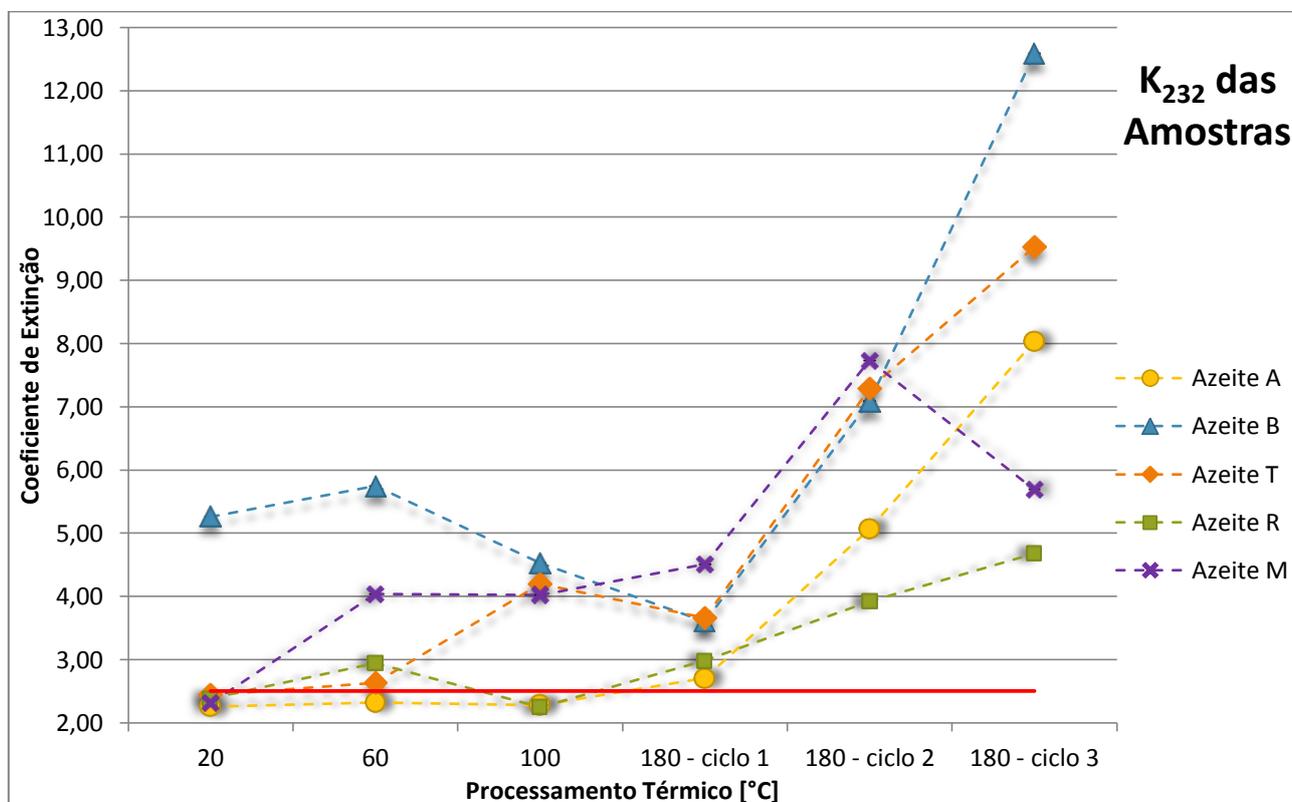


Figura 51 - Variação de K_{232} com o processamento térmico para todos os azeites em estudo

Os azeites estudados apresentam diferenças entre si, sendo facilmente distinguidos conforme indicado na Figura 51. O K_{232} dos azeites analisados varia de acordo com os processamentos térmicos, afetando por ordem crescente os azeites $R < M < B < T < A$. Desta forma, o aumento do K_{232} provocado pelo aquecimento indica a formação de peróxidos e dienos conjugados, ou seja, de produtos de oxidação.

O coeficiente de extinção específica a 270 nm das amostras sem aquecimento prévio mostra-se dentro dos padrões estabelecidos, com valores inferiores a 0,22 para azeites de categoria virgem extra (Figura 52). O K_{270} do azeite M variou menos, seguindo-se os azeites $R < T < A < B$.

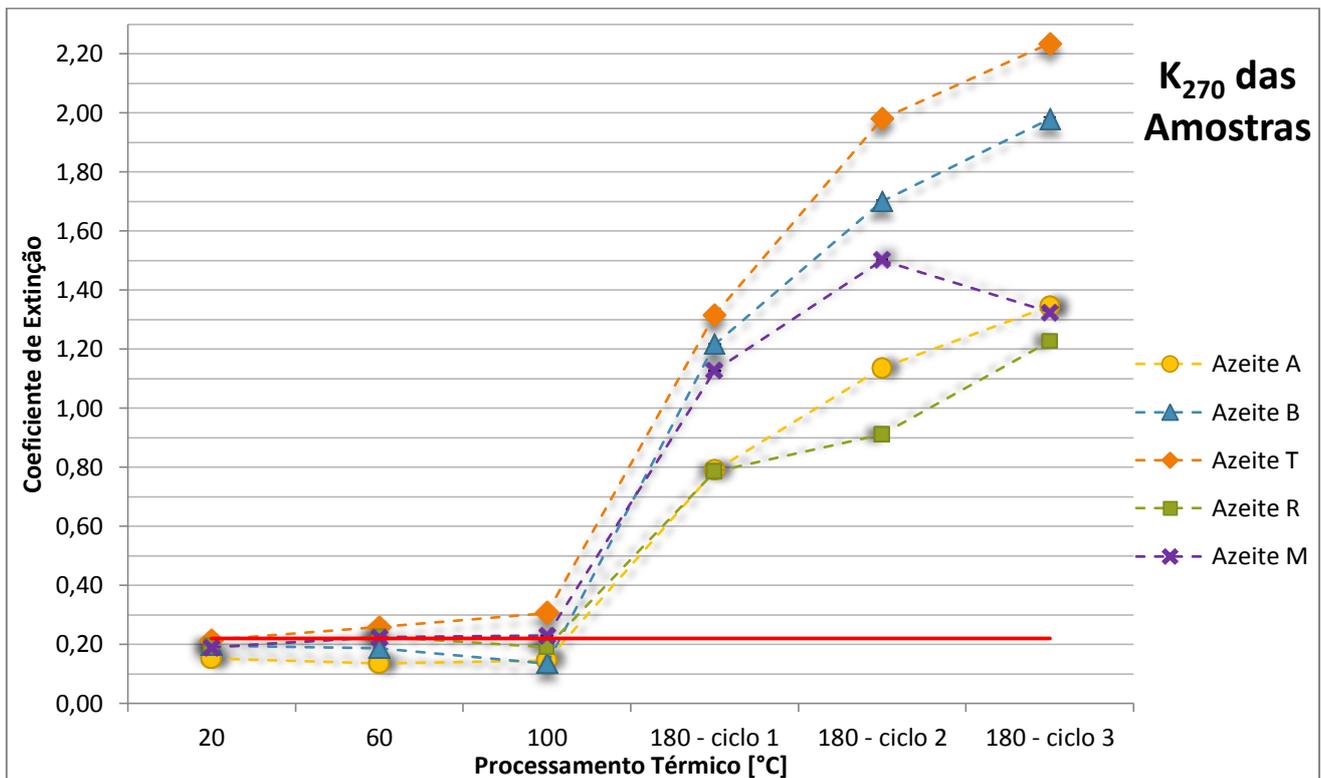


Figura 52 - Variação de K_{270} com o processamento térmico para todos os azeites em estudo

Paralelamente ao observado no parâmetro K_{232} , verifica-se que o aquecimento conduz ao aumento do K_{270} (Figura 52). Adicionalmente, os resultados obtidos permitem concluir que o aumento do número de ciclos conduz ao aumento do parâmetro K_{270} , indicando a formação de produtos secundários resultantes da oxidação bem como trienos conjugados, aldeídos e cetonas.

O processamento térmico moderado provoca alterações nos valores dos coeficientes de extinção (K_{270} e K_{232}), porém o aumento verificado não tem significado estatístico. Em contraste, o aquecimento a temperaturas correspondentes a frituras resulta no aumento de ambos os coeficientes. Estes resultados estão em concordância com os reportados por Quiles et al., 2002, Allouche et al., 2007, Bester et al., 2008, Casal et al., 2010, Martinez-Pineda, 2011 e Santos et al., 2013.

O aumento do K_{270} foi maior que o encontrado para o K_{232} sugerindo que alguns dos produtos de oxidação primária sofreram oxidação adicional, resultando num aumento de produtos secundários de oxidação bem como de trienos conjugados, entre outros.

Face aos resultados obtidos, o processamento moderado parece não provocar alterações suficientes para modificar as características dos azeites avaliados uma vez que os coeficientes de extinção são inferiores aos limites máximos preconizados.

Devido ao aquecimento a temperaturas correspondentes a frituras, os azeites passam a exibir características de óleos de bagaço de azeitona ou de óleos bagaço de azeitona refinados, evidenciadas pelo aumento do K_{270} . Assim, apesar da degradação da sua qualidade, estes azeites ainda exibem valores pertencentes a outras categorias, presumindo-se que ainda são adequados à utilização culinária.

5.3. ANÁLISE DO TEOR DE FENÓIS

5.3.1. MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Efetuar-se-rem retas de calibração a partir dos valores das absorvâncias lidos para as soluções de ácido cafeico de concentrações entre 0,2 e 6 ppm. O teor de fenóis totais foi determinado através das equações das retas obtidas.

$$\text{ppm}_{\text{ácido cafeico}} = \frac{(ABS - b)}{m} \times D \quad [20]$$

em que,

$\text{ppm}_{\text{ácido cafeico}}$ – corresponde ao teor de compostos fenólicos totais;

ABS – leituras das absorvâncias obtidas a 725 nm;

b – intersecção na origem da reta de calibração;

m – declive da reta de calibração;

D – diluição efetuada.

Estes ensaios decorreram em três dias sendo por isso necessário elaborar três retas de calibração. A Tabela 19 mostra as respetivas equações, verificando-se que as retas são bastante semelhantes e apresentam um R^2 elevado.

Tabela 19 - Equações referentes às retas de calibração

N.º	Equações das Retas de Calibração	R^2
1	$ABS = 0,108 \text{ ppm}_{\text{ácido cafeico}} - 0,0087$	0,9978
2	$ABS = 0,0923 \text{ ppm}_{\text{ácido cafeico}} + 0,0004$	0,9952
3	$ABS = 0,0958 \text{ ppm}_{\text{ácido cafeico}} + 0,0028$	0,9942

Na Figura 53 está representado o teor de compostos fenólicos totais em função dos tratamentos térmicos.

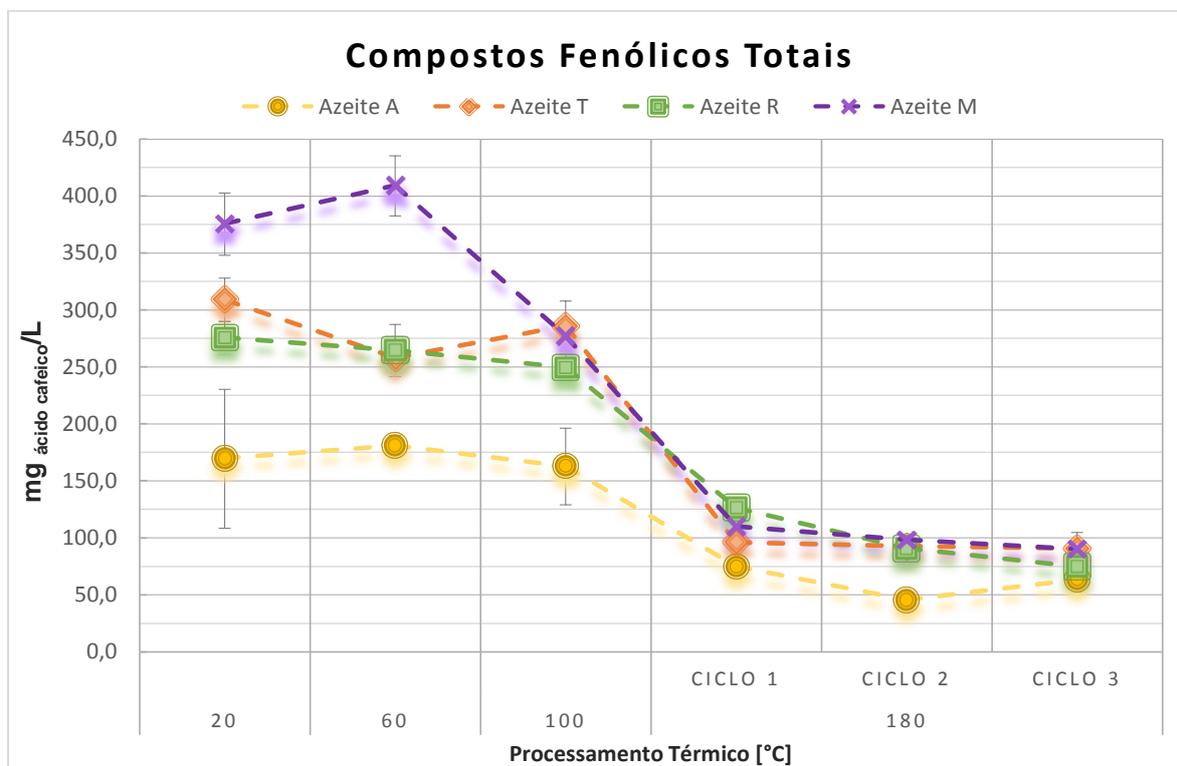


Figura 53 - Representação gráfica do teor de compostos fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu)

Os teores iniciais em fenóis totais das amostras A e M são estatisticamente diferentes, sendo que a amostra A possui o menor teor em compostos fenólicos totais e, em oposição, a amostra M é a que apresenta o teor mais elevado. O azeite em que o teor menos varia é o R e o que apresenta maior variação é o azeite M.

Os resultados apresentados no gráfico da Figura 53 mostram que o aquecimento do azeite provoca alterações nas amostras que se traduziram numa diminuição do teor de compostos fenólicos, embora apenas com significado estatístico para os processamentos a temperaturas correspondentes a frituras. Não são verificadas alterações estatisticamente significativas no teor de compostos fenólicos entre os vários ciclos de frituras. Refere-se a título exemplificativo o azeite A que não apresenta diferenças estatisticamente significativas do teor de fenóis totais na ausência de aquecimento, bem como após aquecimento a 60°C e a 100°C. Ou seja, os processamentos moderados não parecem provocar grandes alterações no teor de fenóis totais. No entanto, o mesmo não se verifica nos processos de fritura onde o parâmetro em estudo diminui.

Quiles et al., 2002 referem que a redução do teor de fenóis como consequência do processo de fritura, deve-se provavelmente à destruição térmica dos mesmos e/ou porque são utilizados na proteção dos óleos vegetais contra a oxidação.

É importante referir que estes compostos são perdidos naturalmente ao longo do tempo, como resultado de processos oxidativos ou hidrolíticos durante o armazenamento.

Para saber se a diminuição do teor de fenóis está relacionada com a ocorrência de oxidação provocada pelo aquecimento e também com a estabilidade de cada azeite, testou-se a sua correlação através do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 24 (B)). O estado oxidativo é dado pelos coeficientes de extinção e pelo índice de peróxidos que têm uma boa correlação negativa com o teor de fenóis obtidos pelo método colorimétrico ($r = -0,740$ para o K_{270} , $r = -0,501$ para o K_{232} e $r = -0,756$ para o índice de peróxidos). Deste modo, a diminuição dos fenóis totais pode ser indicadora da ocorrência de reações de oxidação resultantes do aquecimento.

A Figura 55 mostra, em geral, que o elevado teor de fenóis totais está associado a um menor K_{270} . Em contraste, quando os azeites são submetidos a frituras observa-se a redução deste teor e o aumento considerável do K_{270} . Como exemplo, das amostras analisadas o azeite M apresenta o maior teor de fenóis totais e simultaneamente a menor variação do parâmetro K_{270} , refletido a sua resistência à oxidação (Figura 52).

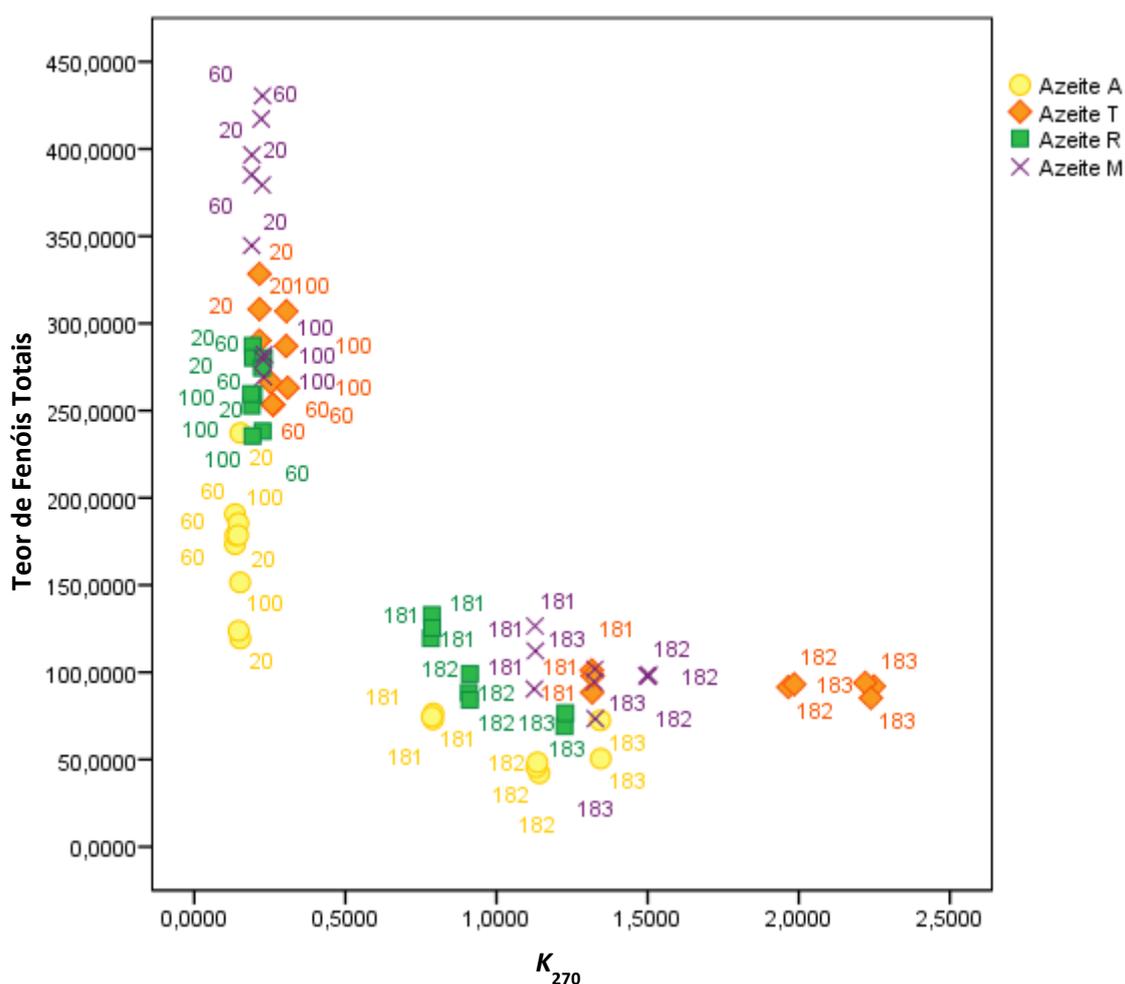


Figura 54 - Gráfico do teor de fenóis totais em função do coeficiente de extração a 270 nm

Os resultados verificados não permitem inferir acerca da adequabilidade dos azeites virgem extra à utilização em processos culinários como as frituras. Seria importante avaliar a atividade antioxidante total bem como o teor mínimo de compostos fenólicos capazes de assegurar a capacidade antioxidante do azeite.

Complementarmente ao teor de fenóis totais das amostras de azeite, interessa determinar a sua composição uma vez que podem estar presentes diferentes compostos apresentando pesos diferentes

sendo, portanto, uns mais importantes que outros. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi utilizada com o propósito de comparar a composição das diferentes amostras antes e após tratamentos térmicos.

5.3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A análise por HPLC das amostras em estudo teve como finalidade avaliar a influência dos processamentos térmicos na composição dos diferentes azeites em estudo. Tendo em conta o valor da área dos picos representados nos cromatogramas foi efetuada uma análise multivariada por componentes principais (PCA) que facilitou a interpretação dos resultados obtidos. A PCA é descrita como uma ferramenta que reduz a redundância de informações num conjunto de dados, a qual se revela vantajosa na análise de óleos vegetais face à complexidade das suas matrizes. Assim, permitiu selecionar as amostras e dividi-las em grupos distintos para uma mais clara diferenciação.

Nas Figuras 55 e 56 encontram-se, a título ilustrativo, os perfis cromatográficos das amostras de azeite M antes e após processamentos térmicos. Os cromatogramas apresentados correspondem à deteção a 280 nm, comprimento de onda característico da absorção dos compostos fenólicos. Para a maioria dos compostos foi utilizada a área do pico obtido este comprimento de onda, contudo em alguns compostos procedeu-se à integração a outros comprimentos de onda (320 e 360 nm) por ser mais fácil o processo de integração (menor interferência pela proximidade de outros compostos ou maior sinal). Nos cromatogramas estão assinalados os picos que mais contribuem para a discriminação das amostras. Deve salientar-se que esta identificação foi efetuada através da comparação visual com cromatogramas presentes na literatura.

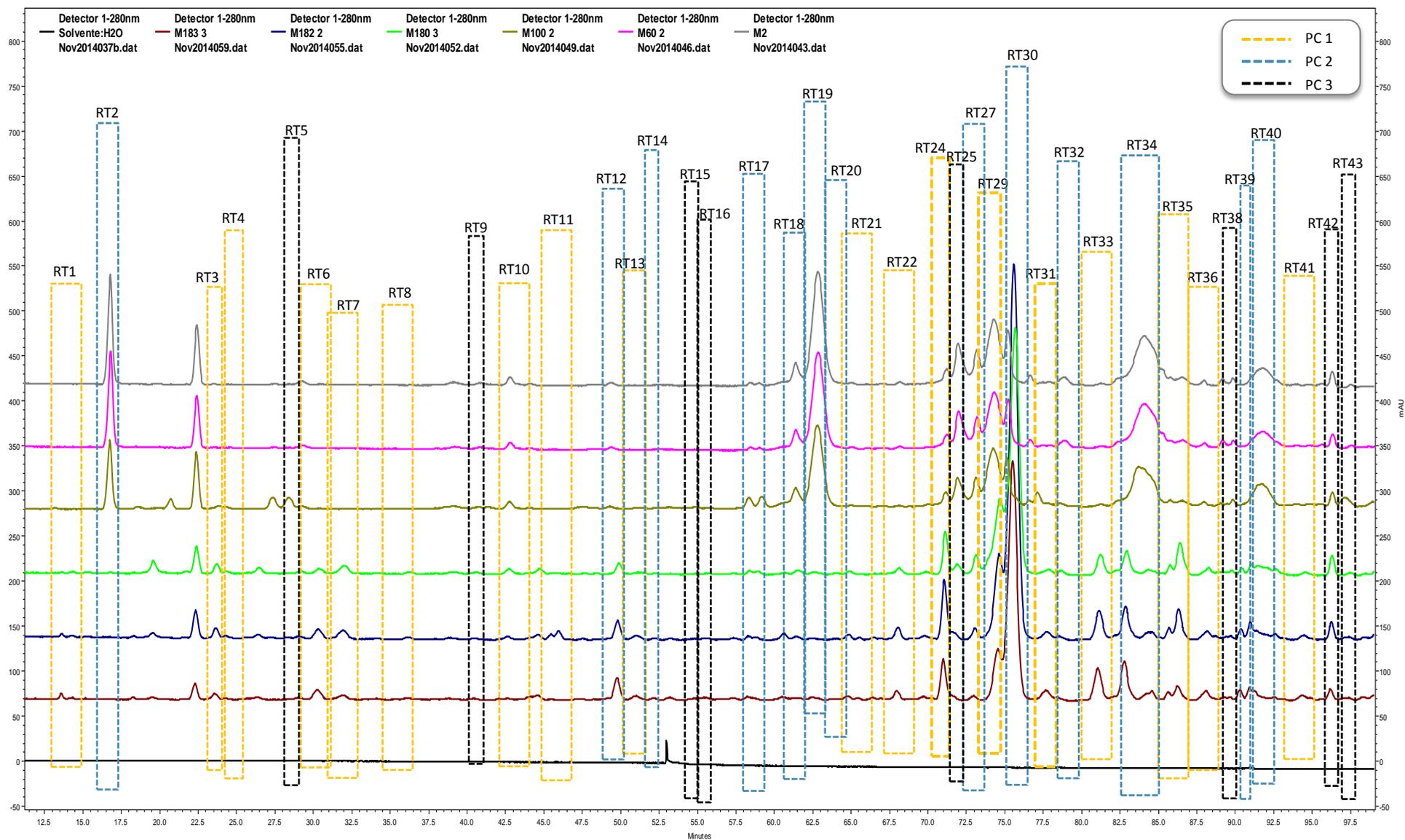


Figura 55 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras M (20°C), M (60°C), M (100°C), M (180°C – primeiro ciclo), M (180°C – segundo ciclo), M (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H₂O) a 280 nm

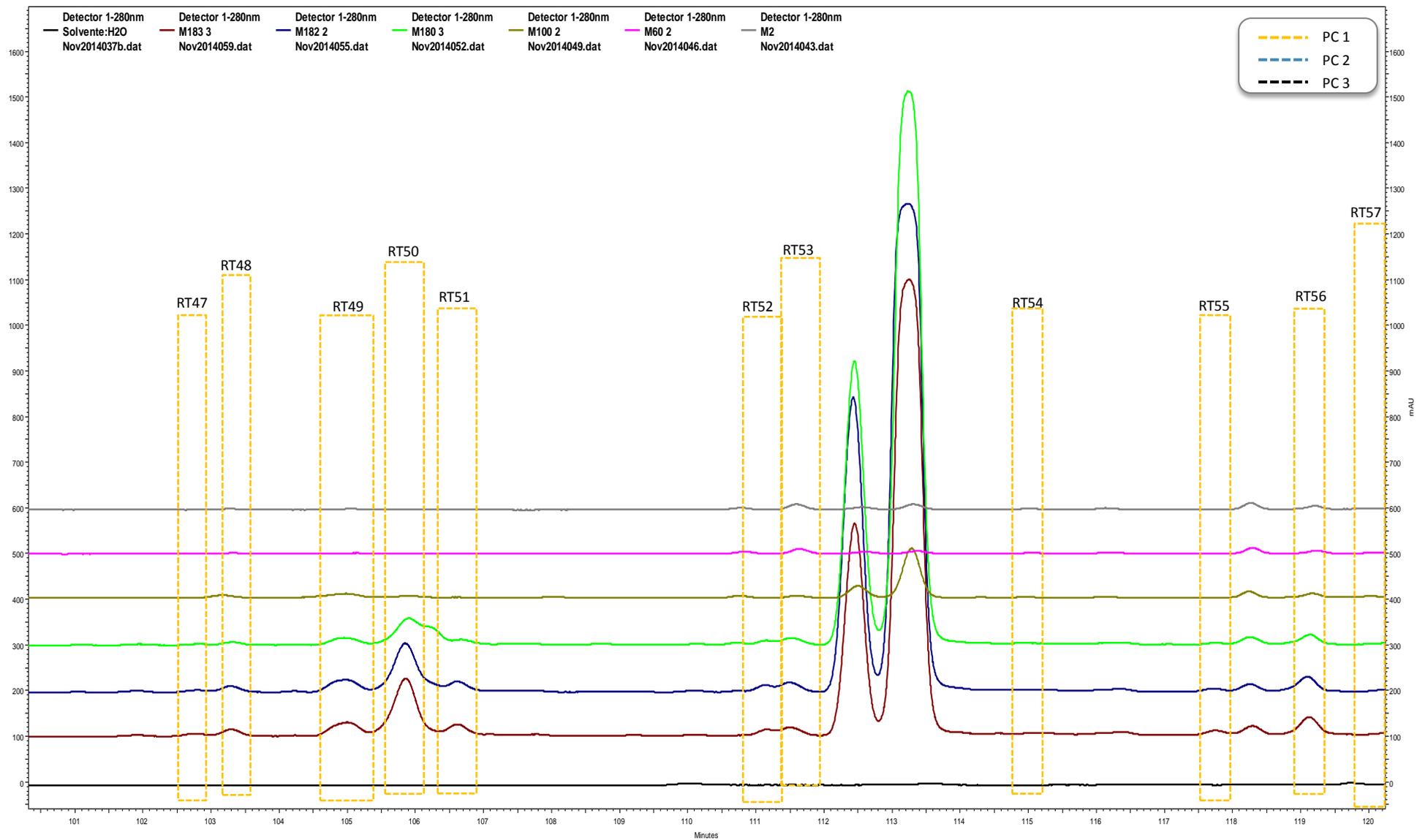


Figura 56 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras M (20°C), M (60°C), M (100°C), M (180°C – primeiro ciclo), M (180°C – segundo ciclo), M (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H₂O) a 280 nm

A comparação dos cromatogramas nas Figuras 55 e 56 mostra que ocorreram alterações nos perfis, associadas ao processamento térmico, tendo alguns compostos diminuído ou aumentado o seu teor após aquecimento.

Análise PCA

Na análise por componentes principais (PCA) foram examinadas 87 amostras e consideradas 63 variáveis, correspondentes às áreas dos picos.

Os valores de variância total acumulada nas diferentes componentes (Tabela 20) indicam que as 5 primeiras componentes refletem 76% da variância total. Na avaliação dos resultados foram somente consideradas as 3 primeiras componentes (variância acumulada 66%). Para a obtenção da matriz rodada foi selecionado o critério Varimax. No que se refere às variáveis consideradas para o tratamento de resultados selecionaram-se aquelas cujo valor de contribuição para as três primeiras componentes foi superior a 0,5 ou inferior a - 0,5 (Tabela 21).

Tabela 20 - Variância total e variância total acumulada nas 3 primeiras componentes principais

Variância Total Explicada			
Componentes	Eigenvalues Iniciais		
	Total	% Variância	% Cumulativa
1	26,674	41,679	41,679
2	8,021	12,533	54,212
3	7,238	11,310	65,522
4	3,969	6,202	71,724
5	2,915	4,554	76,278
6	2,629	4,108	80,386
7	2,127	3,323	83,710
8	1,545	2,414	86,123
9	1,156	1,806	87,929
10	1,050	1,641	89,570

Tabela 21 - Contribuição das variáveis para as 3 primeiras componentes

Matriz de Componentes

N.º Picos	Componentes		
	1	2	3
RT6	,889	,000	-,077
RT22	,857	-,036	-,032
RT36	,848	,254	-,100
RT55	,840	,142	-,062
RT49	,839	,370	-,248
RT29	,838	,042	,006
RT21	,833	,212	-,049
RT61	,830	,111	-,166
RT60	,828	,110	,047
RT1	,826	,043	-,076
RT44	,824	,303	-,036
RT13	,821	,001	-,026
RT41	,819	-,274	-,141
RT23	,805	-,007	-,164
RT47	,802	,213	-,108
RT24	,802	-,401	-,100
RT33	,801	,447	-,294
RT51	,798	,198	-,177
RT56	,796	,464	-,255
RT62	,742	,179	-,180
RT10	,738	,349	-,194
RT31	,737	,113	,106
RT46	,716	-,184	-,130
RT52	,699	,458	-,307
RT7	,678	,436	-,237
RT45	,668	,359	-,252
RT8	,636	,388	-,230
RT50	,633	,567	-,351
RT57	,630	-,002	,187
RT53	,596	,376	-,120
RT11	,589	-,113	-,063
RT3	,585	,503	-,276
RT48	,569	,163	-,303
RT35	,563	,502	-,274
RT4	,556	,322	-,202
RT54	,550	,190	-,140
RT30	-,268	-,786	-,080
RT20	-,138	-,781	-,216
RT27	-,308	,710	-,378
RT2	-,549	-,707	,074
RT34	-,205	-,675	-,101

RT17	-,035	,664	-,337
RT40	,197	-,652	-,181
RT12	,422	,642	-,368
RT19	-,460	-,626	,022
RT14	,146	-,621	-,237
RT18	-,499	-,620	-,008
RT32	-,254	-,613	,148
RT28	-,018	,584	-,442
RT39	-,263	-,535	-,265
RT15	-,061	,132	,887
RT16	,031	,092	,876
RT9	-,177	-,050	,862
RT38	,219	,074	,842
RT26	-,321	-,243	,804
RT37	-,194	-,114	,757
RT59	-,397	-,075	,710
RT25	-,332	,006	,688
RT42	-,031	,496	,655
RT43	-,152	-,426	,642
RT5	,045	,096	,628
RT58	-,441	-,092	,590
RT63	-,222	,423	,559

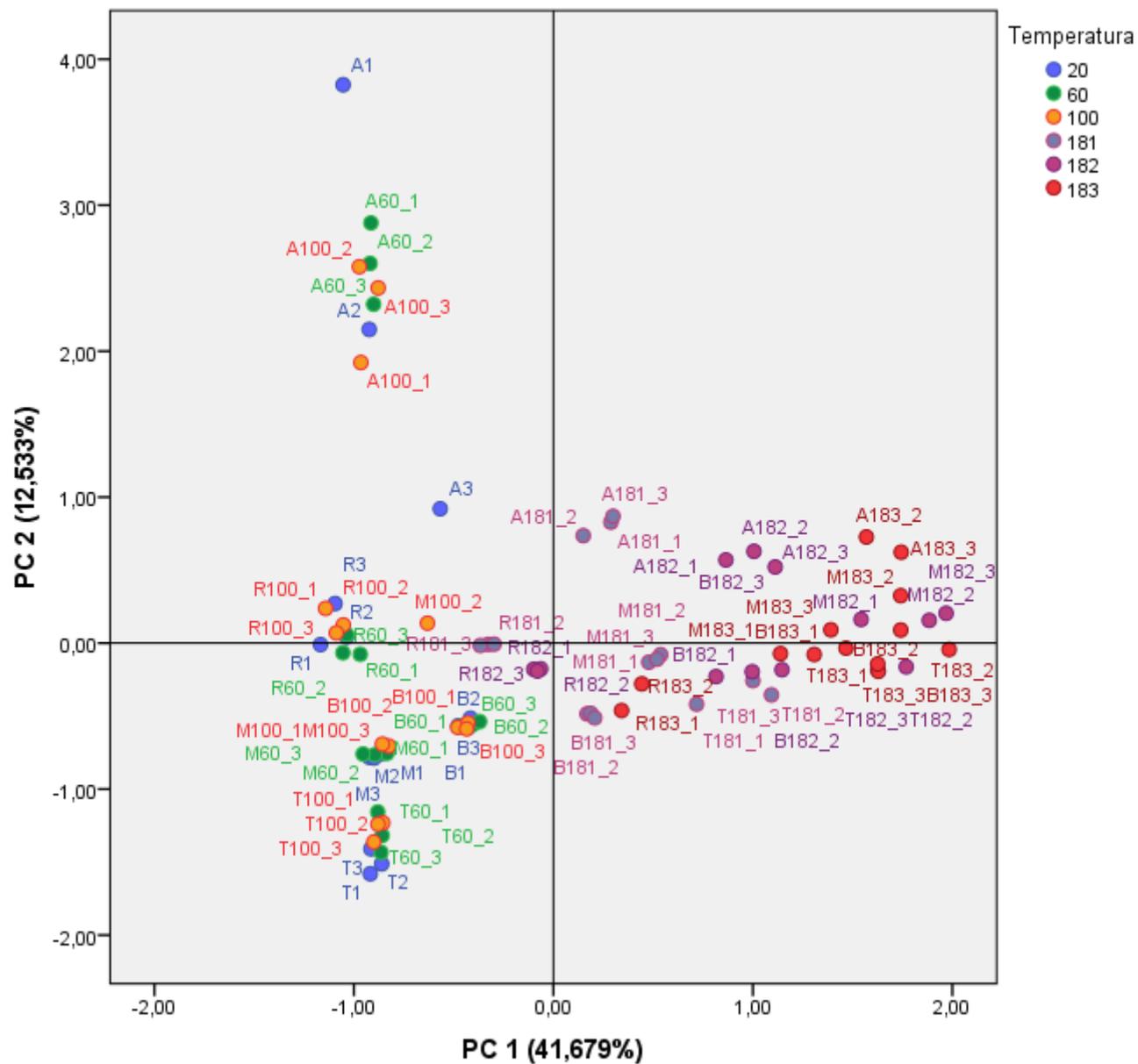


Figura 57 - Projeção das amostras no espaço definido pelas 2 primeiras componentes (variância total acumulada 54,2%)

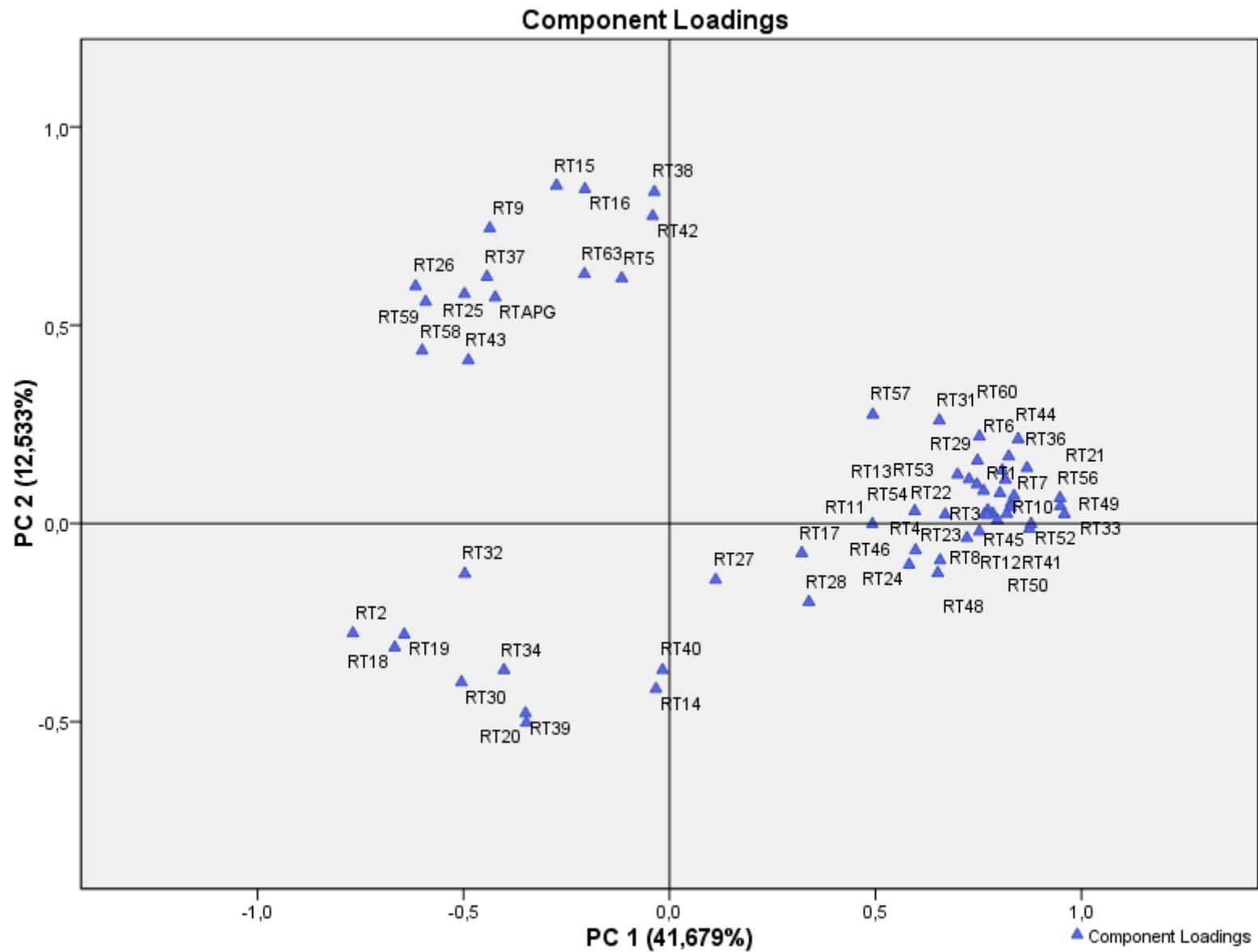


Figura 58 - Distribuição das variáveis (PC 1 e 2)

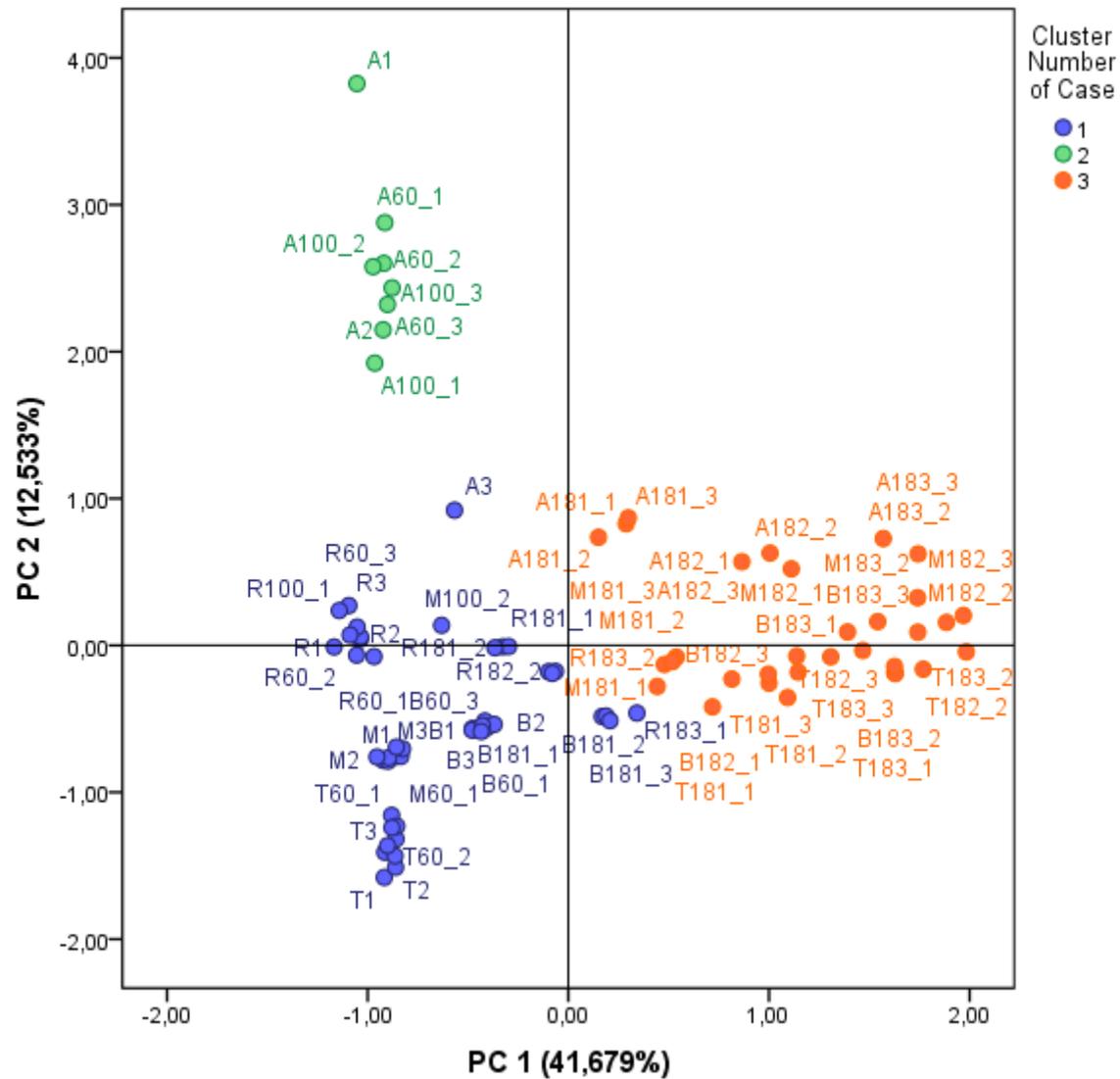


Figura 59 - Representação gráfica da análise de *clusters*

Numa análise dos resultados obtidos podemos afirmar:

- (i) De um modo geral, os triplicados das amostras estão próximos, refletindo que os resultados são repetíveis no respeitante ao processamento das amostras e sua análise;
- (ii) Foi possível discriminar os azeites dos diferentes tipos. Nomeadamente, o azeite A diferencia-se dos restantes por apresentar teores diferentes das variáveis RT5, RT9, RT15, RT16, RT25, RT26, RT37, RT38, RT42, RT43, RT58, RT59 e RT63 (Figuras 55 a 62). Essa distinção deve-se possivelmente ao facto de o azeite A ser monovarietal e os restantes azeites resultarem de uma mistura de várias cultivares, possuindo cultivares em comum e por isso a sua representação gráfica não ser tão dispersa;
- (iii) O aquecimento a 60°C e a 100°C parece não provocar grandes alterações na composição dado que as amostras sujeitas a estas temperaturas não se distinguem das outras que não sofreram aquecimento;
- (iv) As frituras alteram a composição das amostras, que aparecem distanciadas das amostras homónimas sem aquecimento;
- (v) Após processamento de fritura (amostras sujeitas a 180°C em 3 ciclos) não há distinção entre os grupos de amostras, sugerindo que a origem do azeite deixa de ser importante. As variáveis RT1, RT3, RT4, RT6, RT7, RT8, RT10, RT11, RT12, RT13, RT17, RT21, RT22, RT23, RT24, RT27, RT28, RT29, RT31, RT33, RT36, RT41, RT44, RT45, RT46, RT48, RT49, RT50, RT52, RT53, RT54, RT56, RT57 e RT60 contribuem para a discriminação no processo de fritura. Estas são variáveis cujas áreas dos picos aumentam com o aquecimento, ou os compostos são apenas detetados nas amostras sujeitas a temperaturas de 180°C (Figuras 55 a 58).

Assim, face ao exposto, a PC 1 reflete as alterações provocadas pelos tratamentos térmicos, ou seja, esta componente permite discriminar as amostras de acordo com a temperatura a que foram sujeitas, e a PC 2 discrimina conforme a cultivar, nomeadamente para o azeite A.

A análise de *clusters* (Figura 59) permite dividir as amostras em três grupos, confirmando novamente a distinção da amostra A, que se isola quando sujeita a processamentos moderados. Com o aquecimento a 180°C essa distinção deixa de existir; todas as amostras permanecem no mesmo grupo. Assim, o aquecimento a esta temperatura modifica a composição inicial de modo semelhante em todas as amostras.

De um modo geral, os resultados sugerem que os processamentos moderados alteram pouco a composição inicial do azeite, em contraste aos tratamentos correspondentes a frituras. A cultivar utilizada parece ter pouca influência, uma vez que, face o aquecimento, as amostras permanecem no mesmo *cluster* e, conseqüentemente, sofrem alterações de composição semelhantes.

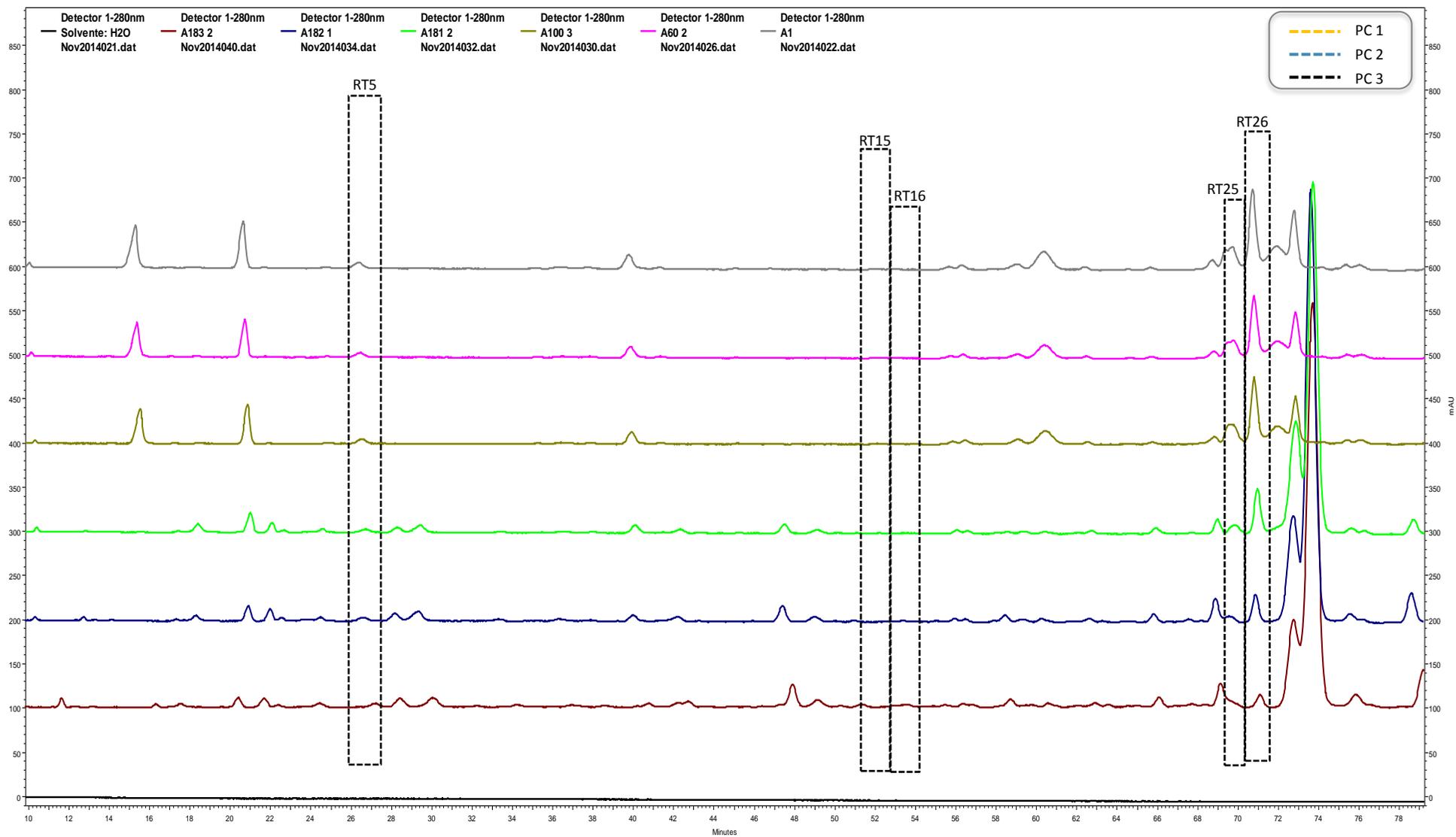


Figura 60 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H₂O) a 280 nm

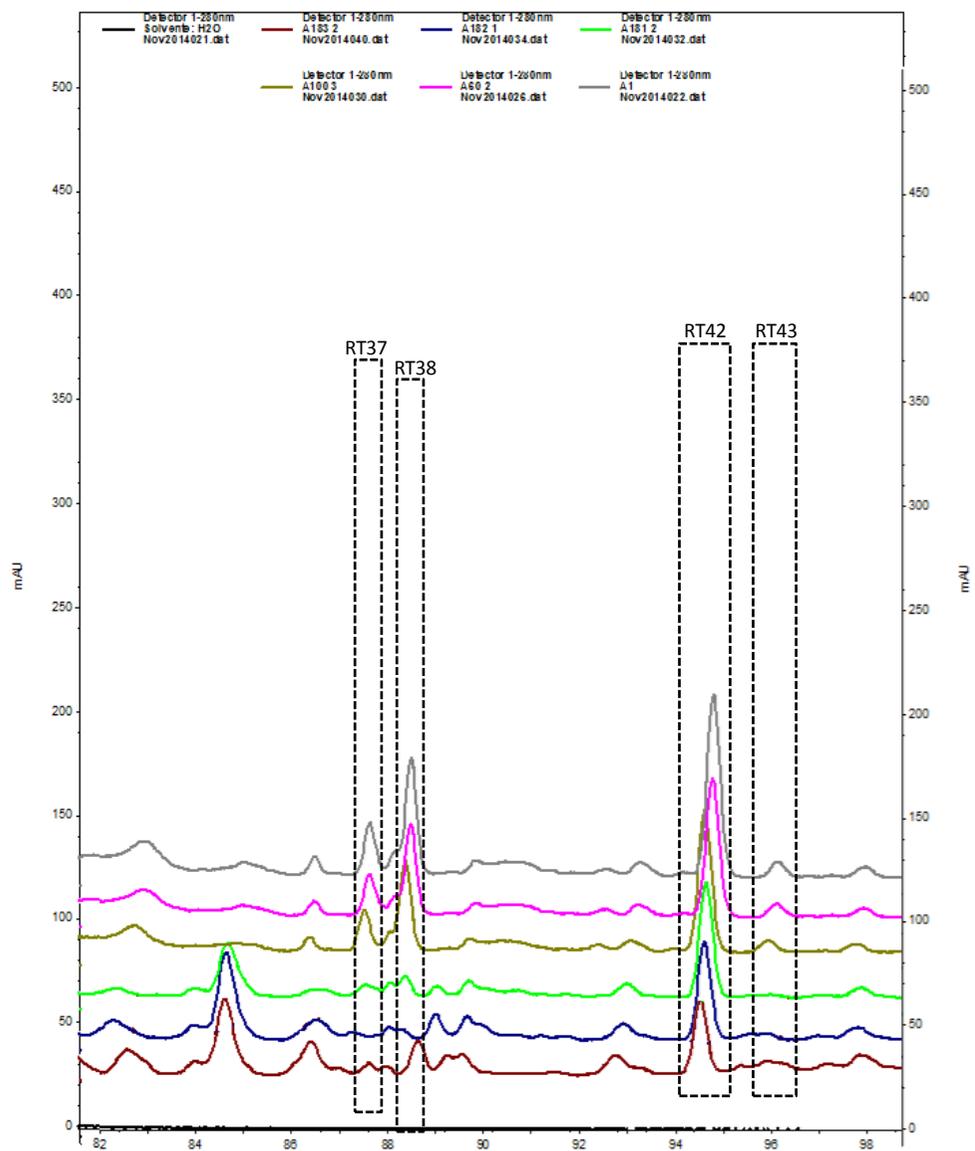


Figura 61 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H₂O) a 280 nm

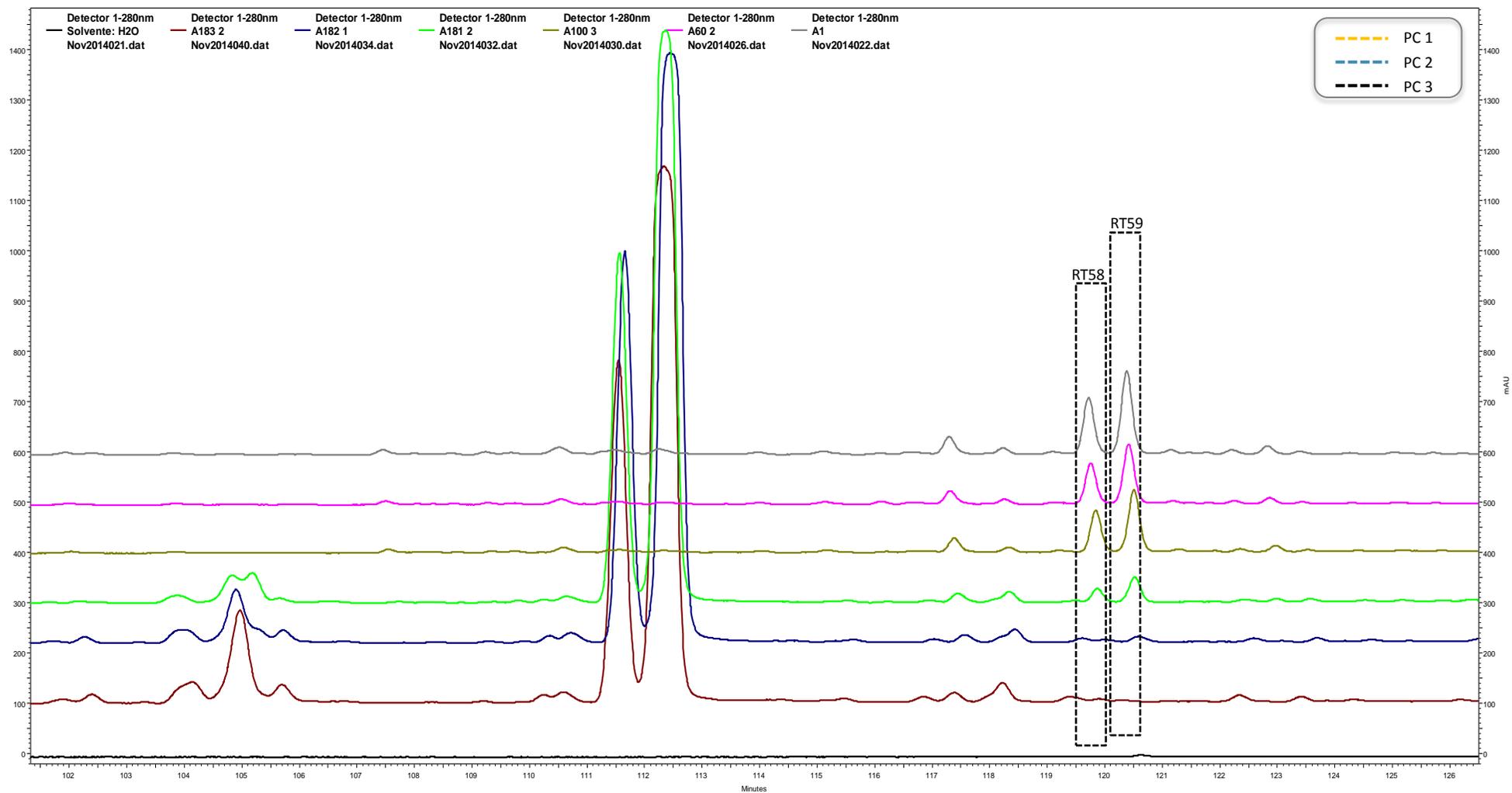


Figura 62 - Comparação dos perfis cromatográficos das amostras A (20°C), A (60°C), A (100°C), A (180°C – primeiro ciclo), A (180°C – segundo ciclo), A (180°C – terceiro ciclo) e solvente (H₂O) a 280 nm

Na Figura 63 encontram-se representados os resultados da análise de correlação entre a concentração de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu e a área total dos compostos detetados a 280 nm pelo HPLC. Os valores foram *standardizados*. Para esta análise foram retirados os dados respeitantes ao azeite B uma vez que não se procedeu à determinação do seu teor de compostos fenólicos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Os resultados mostram que os dois métodos não estão correlacionados com fiabilidade, apresentando um coeficiente de correlação de Pearson significativo mas baixo ($r = -0,459$); ou seja, as relações lineares entre estas variáveis são fracas. Este tipo de relação é evidenciado pela Figura 63 onde se verifica uma dispersão dos dados. Este facto sugere que os compostos detetados pelo HPLC não correspondem na sua totalidade a compostos fenólicos, existindo outras substâncias que também absorvem a 280 nm e que estão a contribuir para a discriminação das amostras e para os subconjuntos dos processamentos térmicos. Nomeadamente, existem picos que apenas surgem nos perfis das amostras sujeitas a 180°C, sugerindo que alguns compostos detetados podem ser produtos da degradação térmica, possivelmente triacilgliceróis oxidados, polímeros e dímeros de triacilgliceróis ou compostos de polaridade intermédia. De acordo com Andrikopoulos et al., 2002, estes últimos ficam distribuídos entre a fração de triacilgliceróis não polar e a fração de material polar total. A formação dos compostos de polaridade intermédia correlaciona-se principalmente com a degradação dos triacilgliceróis e parece ser independente do tipo de óleo utilizado. A sua acumulação ocorre apenas durante os processos de fritura. Esta poderá ser a razão pela qual as amostras não apresentam distinção entre si nas frituras.

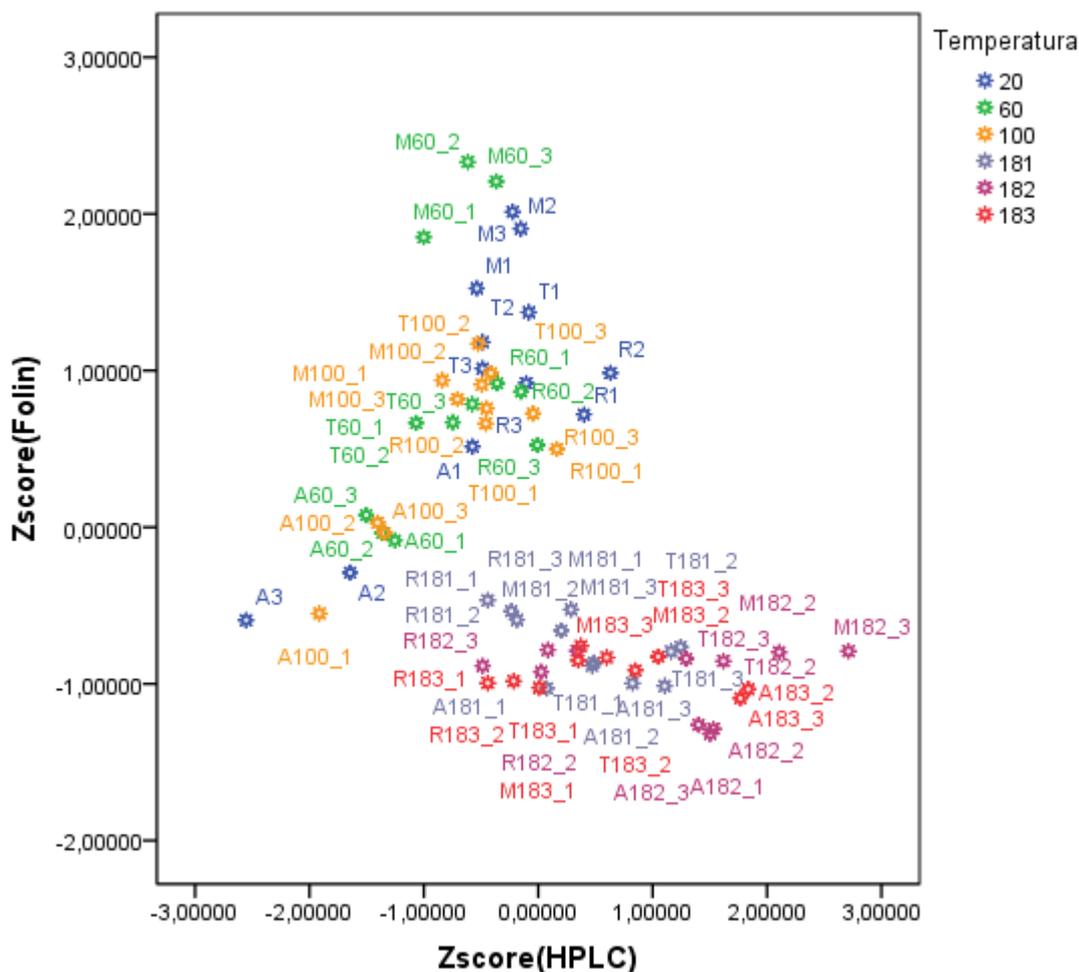


Figura 63 - Gráfico de correlação entre os fenóis totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e a área total dos compostos detetados pelo HPLC

5.4. ANÁLISE CONJUNTA

5.4.1. PCA

De modo a comparar os ensaios reológicos, físico-químicos e o teor de fenóis e outros compostos, efetuou-se uma análise por componentes principais.

Na avaliação dos resultados foram consideradas as duas primeiras componentes (variância acumulada de 72%). Das variáveis globais selecionaram-se aquelas cujo valor de contribuição para as duas primeiras componentes foi superior a 0,5 ou inferior a - 0,5 (Tabela 22). Assim, consideraram-se 52 variáveis, correspondentes ao teor de fenóis totais obtidos pelo método Folin-Ciocalteu, as áreas dos compostos detetados por HPLC, bem como os parâmetros K_{270} , K_{232} , densidade e os índices de peróxidos e de iodo (Tabela 23). Os valores foram *standardizados*.

Para esta nova análise não foram considerados os dados respeitantes ao azeite B uma vez que não se procedeu à determinação do seu teor de compostos fenólicos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Tabela 22 - Variância total e variância total acumulada nas 2 primeiras componentes principais

Variância Total Explicada			
Componentes	Eigenvalues Iniciais		
	Total	% Variância	% Cumulativa
1	29,879	57,459	57,459
2	7,697	14,802	72,261
3	3,169	6,094	78,355
4	2,292	4,407	82,763
5	1,785	3,433	86,195
6	1,360	2,615	88,810

Tabela 23 - Contribuição das variáveis para as 2 primeiras componentes

	Componentes	
	1	2
Zscore (RT33)	,964	,195
Zscore (RT56)	,964	,093
Zscore (RT6)	,953	,170
Zscore (RT49)	,952	,194
Zscore (RT50)	,950	,166
Zscore (K ₂₇₀)	,927	,250
Zscore (RT12)	,925	,200
Zscore (RT29)	,920	,090
Zscore (RT22)	,910	,157
Zscore (RT44)	,903	-,025
Zscore (RT52)	,890	,210
Zscore (RT36)	,855	,111
Zscore (RT13)	,850	,122
Zscore (RT2)	-,849	,267
Zscore (RT7)	,846	,082
Zscore (RT55)	,834	,098
Zscore (Fenóis)	-,831	,275
Zscore (RT35)	,828	,151
Zscore (K ₂₃₂)	,818	,339
Zscore (RT61)	,814	,203
Zscore (RT8)	,812	,171
Zscore (RT51)	,811	,209
Zscore (RT18)	-,811	,318
Zscore (RT21)	,808	,092
Zscore (RT10)	,807	,135
Zscore (RT47)	,805	,125
Zscore (RT60)	,800	,028
Zscore (RT3)	,785	,077
Zscore (RT19)	-,781	,313

Zscore (RT1)	,779	,182
Zscore (RT41)	,779	,378
Zscore (Densidade)	,756	,244
Zscore (RT45)	,748	,173
Zscore (RT53)	,741	-,022
Zscore (RT23)	,731	,255
Zscore (Peróxidos)	,725	,047
Zscore (RT62)	,723	,195
Zscore (RT24)	,695	,433
Zscore (RT30)	-,648	,468
Zscore (RT42)	-,071	-,915
Zscore (RT15)	-,095	-,854
Zscore (RT16)	-,030	-,820
Zscore (RT9)	-,325	-,805
Zscore (RT38)	,164	-,782
Zscore (RT63)	-,099	-,758
Zscore (RT59)	-,515	-,687
Zscore (RT26)	-,578	-,679
Zscore (RT25)	-,395	-,664
Zscore (Iodo)	-,519	,646
Zscore (RT37)	-,378	-,634
Zscore (RT20)	-,486	,595
Zscore (RT58)	-,531	-,542

Nas Figuras 64 a 66 encontram-se representados os resultados da PCA e posterior análise de *clusters*. Estes resultados mostram:

- (i) Foi possível discriminar os diferentes azeites, verificando-se que o A diferencia-se dos restantes por apresentar teores diferentes dos compostos representados pelas variáveis RT9, RT15, RT16, RT25, RT26, RT37, RT38, RT42, RT58, RT59 e RT63;
- (ii) Os processamentos moderados não provocam grandes alterações na composição uma vez que as amostras sujeitas a aquecimentos a 60°C e a 100°C não se distinguem das respetivas amostras que não sofreram aquecimento;
- (iii) A presença de 3 *clusters* faz a distinção, de um modo geral, entre as amostras A (sem aquecimento e para processamentos de 60°C, 100°C e do primeiro ciclo a 180°C) e as amostras submetidas a aquecimentos a 180°C. Assim, após tratamentos de 180°C os resultados são bastante semelhantes para todas as amostras;
- (iv) Variáveis como RT1, RT3, RT6, RT7, RT8, RT10, RT12, RT13, RT21, RT22, RT23, RT24, RT29, RT41, RT44, RT45, RT47, RT49, RT50, RT51, RT52, RT53, RT56, RT60, RT61 e RT62 contribuem para a discriminação do grupo das frituras, conforme verificado previamente na secção 5.3.2.;
- (v) Os processamentos de frituras são também discriminados por variáveis como o K_{270} , K_{232} e o índice de peróxidos, responsáveis pela avaliação do estado oxidativo. Assim, os produtos da oxidação provocada pela degradação térmica parecem contribuir para a distinção observada neste grupo.

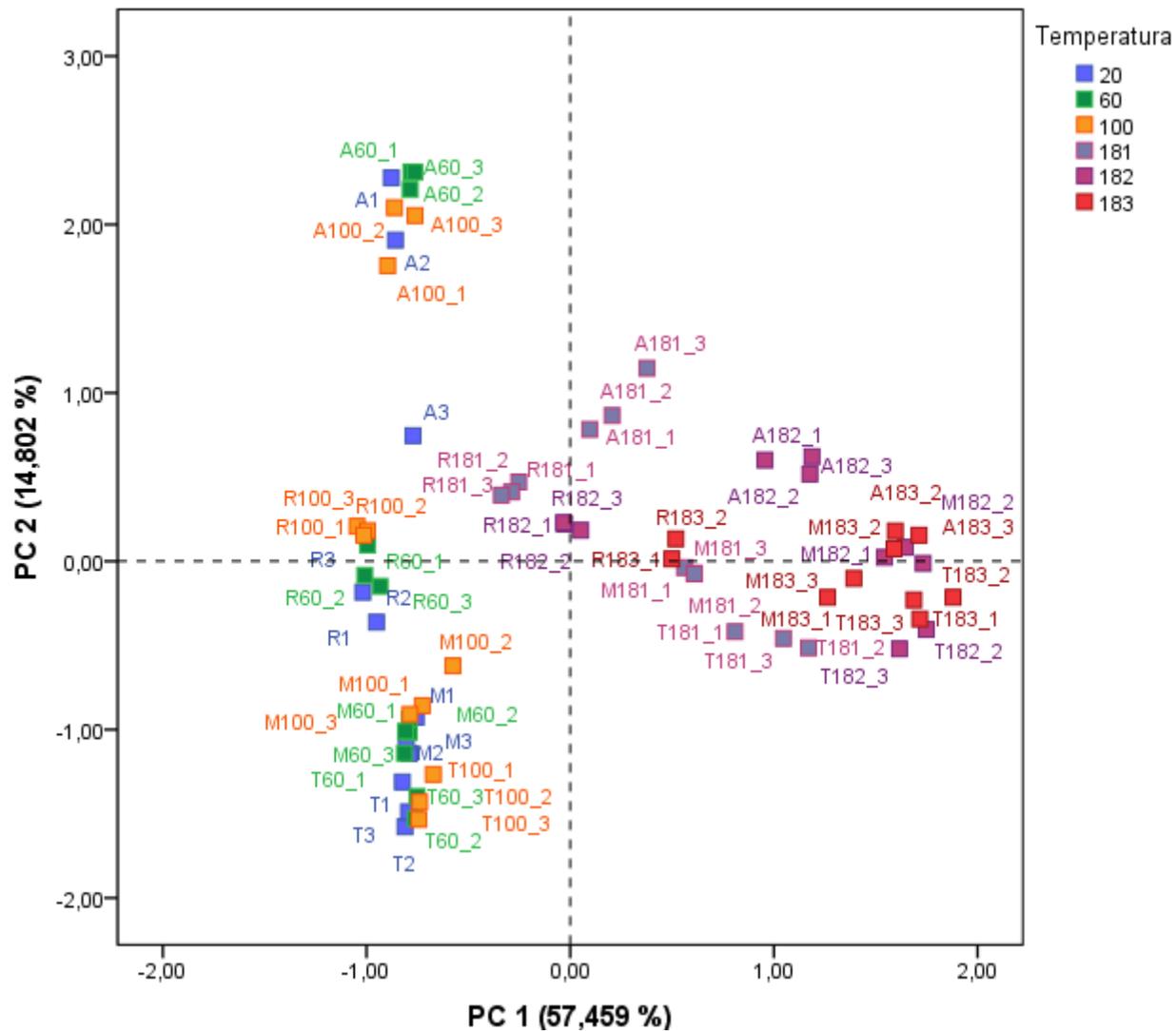


Figura 65 - Projeção das amostras no espaço definido pelas 2 primeiras componentes (variância total acumulada 72,3%)

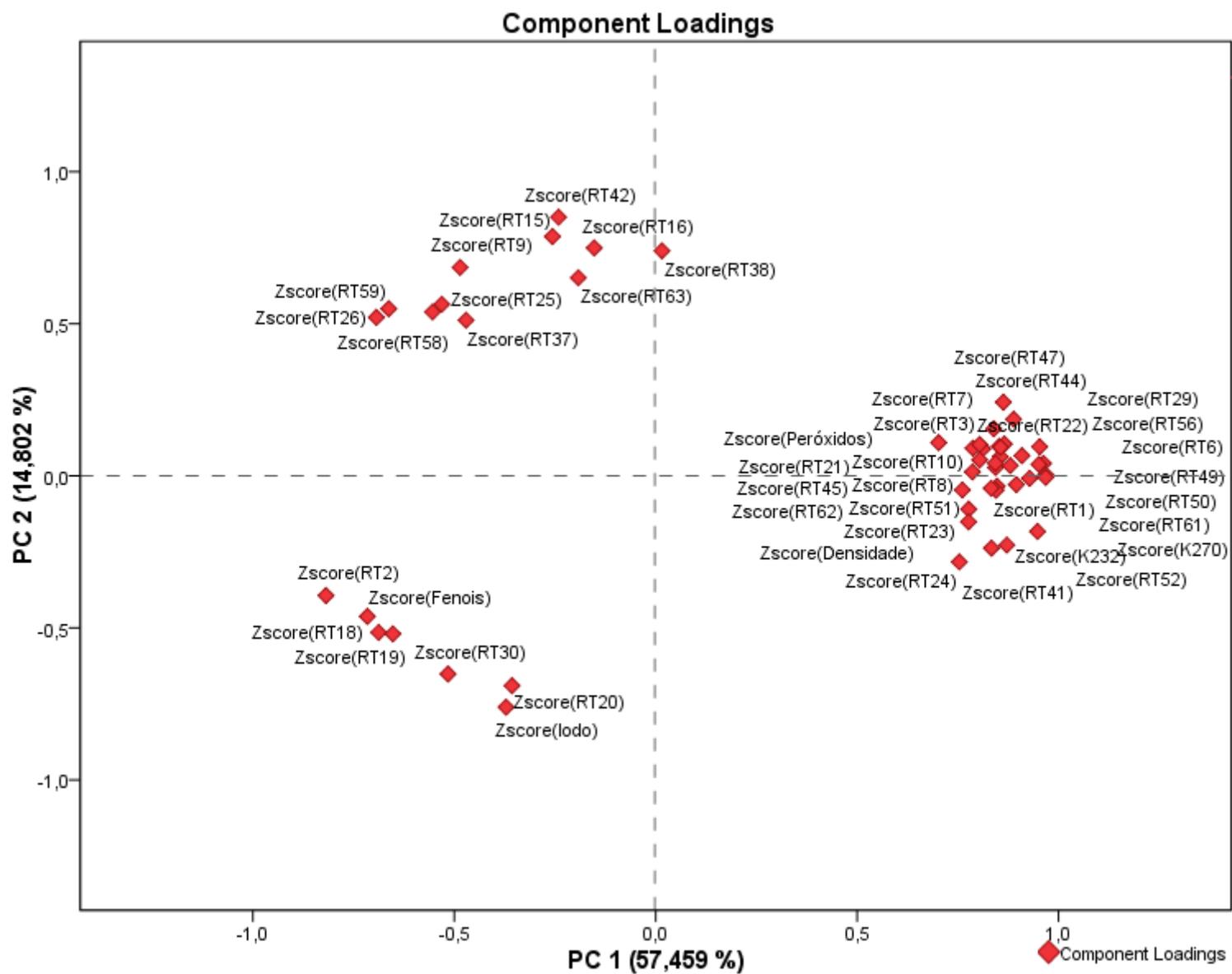


Figura 66 - Distribuição das variáveis (PC 1 e 2)

5.4.2. CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS ESTUDADOS

Foi aplicado um método de análise bivariada com estudo da relação linear entre as variáveis através dos coeficientes de correlação linear de Pearson (r). Os coeficientes de correlação de Pearson entre os valores analíticos (referentes à ausência de aquecimento e aos processamentos térmicos analisados) foram calculados para estudar o grau de associação entre os diversos parâmetros considerados. Como referido no Capítulo 4, considerou-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Na Tabela 24 estão assinalados os coeficientes de correlação superiores a 0,5 e inferiores a -0,5, indicando relações moderadas ou fortes. Para a análise da correlação com o teor de compostos fenólicos não foram selecionadas as amostras de azeite B, uma vez que este procedimento não foi efetuado.

Tabela 24 - Correlação entre os diversos parâmetros avaliados

(A)

	I. Saponificação		I. Acidez		I. Bellier		Viscosidade		N
	r	ρ	r	ρ	r	ρ	r	ρ	
Densidade Relativa	0,367	**	0,668	**	-0,038	s.s.	0,608	**	90
I. Acidez	0,560	**	-	-	0,245	*	0,573	**	90
I. Bellier	0,417	**	0,245	*	-	-	0,029	s.s.	90
I. Iodo	-0,542	**	-0,601	**	-0,254	*	-0,470	**	90
I. Peróxidos	0,714	**	0,855	**	0,209	*	0,639	**	90
I. Refração	0,201	s.s.	0,141	s.s.	0,191	s.s.	0,149	s.s.	90
I. Saponificação	-	-	0,560	**	0,417	**	0,583	**	90
K_{232}	0,233	*	0,541	**	-0,139	s.s.	0,498	**	90
K_{270}	0,538	**	0,553	**	0,116	s.s.	0,673	**	90
Teor de Fenóis Totais (Método Folin-Ciocalteu)	-0,632	**	-0,543	**	-0,303	*	-0,635	**	72
Viscosidade	0,583	**	0,573	**	0,029	s.s.	-	-	90

** $\rho \leq 0,01$

* $\rho \leq 0,05$

s.s. - sem significado

(B)

	Teor de Fenóis Totais		N
	r	ρ	
Densidade Relativa	-0,512	**	72
I. Acidez	-0,543	**	72
I. Bellier	-0,303	*	72
I. Iodo	0,673	**	72
I. Peróxidos	-0,756	**	72
I. Refração	-0,209	s.s.	72
I. Saponificação	-0,632	**	72
K_{232}	-0,501	**	72
K_{270}	-0,740	**	72
Viscosidade	-0,635	**	72

** $\rho \leq 0,01$

* $\rho \leq 0,05$

s.s. - sem significado

(C)

	Densidade Relativa		K_{232}		K_{270}		I. Iodo		I. Peróxidos		I. Refração		N
	r	ρ	r	ρ	r	ρ	r	ρ	r	ρ	r	ρ	
Densidade Relativa	-	-	0,809	**	0,782	**	-0,388	**	0,683	**	0,380	**	90
I. Acidez	0,668	**	0,541	**	0,553	**	-0,601	**	0,855	**	0,141	s.s.	90
I. Bellier	-0,038	s.s.	-0,139	s.s.	0,116	s.s.	-0,254	*	0,209	*	0,191	s.s.	90
I. Iodo	-0,388	**	-0,275	**	-0,417	**	-	-	-0,586	**	-0,186	s.s.	90
I. Peróxidos	0,683	**	0,579	**	0,759	**	-0,586	**	-	-	0,172	s.s.	90
I. Refração	0,380	**	0,402	**	0,418	**	-0,186	s.s.	0,172	s.s.	-	-	90
I. Saponificação	0,367	**	0,233	*	0,538	**	-0,542	**	0,714	**	0,201	s.s.	90
K_{232}	0,809	**	-	-	0,779	**	-0,275	**	0,579	**	0,402	**	90
K_{270}	0,782	**	0,779	**	-	-	-0,417	**	0,759	**	0,418	**	90
Teor de Fenóis Totais (Método Folin-Ciocalteu)	-0,512	**	-0,501	**	-0,740	**	0,673	**	-0,756	**	-0,209	s.s.	72
Viscosidade	0,608	**	0,498	**	0,673	**	-0,470	**	0,639	**	0,149	s.s.	90

** $\rho \leq 0,01$ * $\rho \leq 0,05$

s.s. - sem significado

Verifica-se que a viscosidade se relaciona positivamente, por ordem decrescente, com o K_{270} , o índice de peróxidos, a densidade relativa, o índice de saponificação e o índice de acidez (Tabela 24 (A)). Deste modo, nas condições de processamentos avaliadas, o aumento da viscosidade relaciona-se com o aumento de ácidos gordos sob a forma livre, bem como com a formação de produtos de oxidação e com a diminuição do comprimento das cadeias de ácidos gordos. Por sua vez, o índice de iodo e o teor de fenóis totais exibem uma correlação negativa com a viscosidade, sugerindo que o aumento deste parâmetro reológico está também relacionado com a diminuição do grau de insaturação dos ácidos gordos (quebras de ligações duplas) e a diminuição do teor dos compostos fenólicos totais. Assim, estes resultados sugerem que a variação da viscosidade, designadamente o seu aumento, indicia modificações ocorridas no azeite, por isso, este parâmetro reológico pode ser utilizado como indicador de alterações e, conseqüentemente, inferir sobre a qualidade do azeite.

Diversos estudos verificaram uma correlação elevada entre a viscosidade do óleo alimentar e a sua composição em ácidos gordos, sendo que a viscosidade aumenta com o tamanho da cadeia de ácidos gordos constituintes dos triacilgliceróis e diminui com o seu grau de insaturação. Isto sugere que os óleos alimentares que contêm um maior número de ligações duplas exibem uma viscosidade mais baixa (Abramovic e Klofutar, 1998, Kalogianni et al., 2011, Kim et al., 2010, Bonnet et al., 2011, Dehghannejad et al., 2013 e Gila et al., 2014). Excetuando o índice de saponificação, as relações obtidas são concordantes com as reportadas na literatura que, na sua grande maioria, são obtidas sem processamentos térmicos.

Na Tabela 24 (C) registam-se correlações razoáveis entre algumas das propriedades avaliadas, apresentando valores de r entre 0,5 e 0,6. Verificam-se também correlações muito fortes, nomeadamente entre o índice de peróxidos e outros parâmetros como o índice de acidez ($r = 0,855$), o K_{270} ($r = 0,759$), o índice de saponificação ($r = 0,714$) e o teor de fenóis totais obtido pelo método Folin-Ciocalteu ($r = -0,756$). A relação negativa existente entre o índice de peróxidos e o teor de compostos fenólicos reflete que o aumento das reações de oxidação coincide com o consumo dos fenóis, como já reportado na literatura. Os coeficientes de extinção a 270 nm e a 232 nm exibem uma correlação muito forte ($r = 0,779$) entre si. Deste modo, a determinação destes coeficientes pode ser utilizada como método alternativo ao índice de peróxidos uma vez que este último é considerado inadequado para a avaliação das reações de oxidação ocorridas no azeite durante o aquecimento.

Adicionalmente, o índice de peróxidos exhibe uma correlação negativa média com o índice de iodo ($r = -0,586$). A taxa de oxidação é proporcional ao grau de insaturação das cadeias, ou seja, a diminuição do índice de iodo remete para o aumento da taxa de oxidação durante a fritura. Portanto, a estabilidade oxidativa não depende apenas de um parâmetro, sendo afetada pela composição de ácidos gordos e pela relação entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes, como também confirmado por Chatzilazarou et al., 2006, Bester et al., 2008 e Sánchez-Gimeno et al., 2008.

Por último, a densidade relativa exhibe uma correlação positiva alta com ambos os coeficientes ($r = 0,809$ para K_{232} e $r = 0,782$ para K_{270}), possivelmente devido à formação de compostos de elevado peso molecular, resultantes das reações de polimerização provocadas pelo aquecimento (Tabela 27 (C)).

CAP. 6 – CONCLUSÕES FINAIS

A relação entre a temperatura e a viscosidade é adequadamente descrita pela equação de Arrhenius em que a viscosidade decresce de forma exponencial com o aumento da temperatura.

Todas as amostras revelam padrões de escoamento semelhantes, com uma relação linear entre a tensão de corte e velocidade de corte, demonstrando um comportamento newtoniano.

A energia de ativação de fluxo indica a sensibilidade da viscosidade às mudanças de temperatura, apresentando uma relação de proporcionalidade direta entre si. Verificou-se também que os maiores valores de viscosidade correspondem aos maiores valores da energia de ativação.

A viscosidade dos azeites virgem extra varia quando são sujeitos a processos culinários. O processamento térmico induz o aumento da viscosidade que é comprovado pelo facto da viscosidade dinâmica aumentar nos azeites investigados à medida que a temperatura de processamento térmico aumenta. Adicionalmente, para o grupo referente às frituras, a viscosidade aumenta com o número de operações de fritura. Todavia, este padrão não é observado para alguns dos azeites estudados, quando submetidos a aquecimentos a 60°C.

A análise das propriedades reológicas dos azeites estudados sugere um comportamento newtoniano, mesmo após aquecimento nas condições previstas neste trabalho. No entanto, refere-se que a investigação da viscosidade num intervalo mais amplo de velocidades de corte é necessária no âmbito da obtenção de resultados mais conclusivos.

Não são encontrados efeitos tixotrópicos para os azeites estudados.

Verificou-se também que o aumento da viscosidade reflete a diminuição do teor de compostos fenólicos e o conseqüente aumento de produtos de oxidação.

Os métodos reológicos aplicados aos azeites estudados neste trabalho permitiram obter resultados importantes para a percepção da degradação da qualidade do azeite. A existência de compostos indesejáveis, resultantes da degradação térmica do azeite, pode assim ser verificada pela aplicação de métodos reológicos, através da avaliação da viscosidade e do estudo da sua variação em função de várias condições de processamento térmico. De um modo geral, os parâmetros reológicos podem ser utilizados como indicativos da degradação dos óleos vegetais, com relevantes aplicações industriais a nível dos sistemas de produção e armazenamento dos azeites.

A análise dos parâmetros físico-químicos avaliados permite constatar que o processamento térmico provoca alterações na composição dos azeites virgem extra, indicando que a degradação térmica é responsável pelo detrimento da sua qualidade. No entanto, para aquecimentos até 100°C essas modificações não foram expressivas sob o ponto de vista estatístico, para além de que os parâmetros obedecem aos limites estipulados na legislação vigente e no Codex Alimentarius, 2001, embora sendo definidos para amostras sem aquecimento. Assim, os azeites virgem extra ainda exibem características favoráveis quando as confeções culinárias simples que os utilizam são moderadas, uma vez que de um modo geral, os valores dos parâmetros analisados não variam significativamente com os determinados para a ausência de processamento.

Em contraste, as amostras sujeitas a aquecimentos repetidos a 180°C, correspondentes a frituras, revelaram modificações consideráveis na maioria dos parâmetros analisados. Verificou-se um aumento dos valores dos parâmetros físico-químicos analisados, tais como os índices de acidez, de peróxidos e de saponificação, bem como os coeficientes de extinção específica e a densidade relativa, para valores superiores aos limites máximos propostos. Não obstante, quando os limites são excedidos apenas poderemos dizer que os azeites já não cumprem os requisitos necessários para a categoria de azeites virgem extra, e não necessariamente que são inadequados ao uso em determinadas técnicas culinárias, nomeadamente a fritura.

Para alguns dos parâmetros avaliados, os azeites estudados ainda possuem características que permitem uma classificação diferente de virgem extra, mesmo após aquecimentos a três ciclos de 180°C com duração de 30 minutos, podendo, por isso, serem considerados adequados ao uso culinário. Como exemplo refere-se o índice de acidez.

Assim, existe a necessidade de se avaliar a concentração de compostos tóxicos e também o grau de comprometimento nutricional e metabólico que os mesmos podem induzir, de modo a serem determinados os valores dos parâmetros que podem ser prejudiciais à saúde do consumidor, e ser possível estabelecer um limite à utilização desse azeite.

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentam uma ambiguidade, sendo que determinados parâmetros sugerem que o azeite é adequado aos processos de fritura (K_{232} , K_{270} , índice de acidez e índice de iodo) mas outros parâmetros aumentaram para valores sobre os quais não existe certeza de que sejam adequados ao consumo. Por exemplo, o índice de peróxidos aumenta consideravelmente nas amostras sujeitas repetidamente a 180°C, apresentando valores sobre os quais não existe certeza acerca da prejudicialidade para o consumidor.

O aquecimento conduziu à degradação do conteúdo de fenóis totais dos azeites virgem extra, nomeadamente após processamentos a 180°C. Adicionalmente, o teor de compostos fenólicos apresentou uma correlação muito forte com o K_{270} e com o índice de peróxidos, indicando que a diminuição da capacidade antioxidante dos azeites virgem extra está relacionada com a diminuição dos fenóis totais.

Os métodos analíticos utilizados neste estudo indicam o estado de deterioração do azeite. No entanto, nenhum parâmetro sozinho permite inferir de forma adequada e em todas as situações, a qualidade e o conseqüente tempo de utilização do azeite virgem extra. Assim, os resultados obtidos sobre a adequabilidade da utilização do azeite virgem extra para frituras não são claros. Para tal seria necessário saber quais os valores dos compostos produzidos pelo aquecimento a temperaturas elevadas que provocam danos na saúde do consumidor.

CAP. 7 – TRABALHOS FUTUROS

Existem diversos parâmetros que podem ser utilizados na avaliação da degradação térmica dos óleos alimentares provocada pelos procedimentos culinários. Uma vertente interessante prende-se com questões despontadas na execução deste trabalho, como por exemplo, inferir sobre o comportamento observado em determinados azeites virgem extra após sujeição a processamentos a 60°C. Adicionalmente, poderiam ser efetuados novos ensaios com o propósito de desenvolver correlações suficientemente fortes que conduzam à determinação mais precisa do ponto de descarte para diferentes óleos de fritura.

Deste modo, salientam-se algumas perspetivas futuras:

- Determinação do perfil reológico das amostras com a aplicação de um intervalo de velocidades de corte mais amplo, a fim de obter resultados mais conclusivos;
- Estudo da viscoelasticidade das amostras de azeite com um reómetro em modo oscilatório para inferir sobre a microestrutura;
- Avaliação das alterações microestruturais decorrentes do processamento térmico dos azeites;
- Avaliação da energia de ativação de fluxo em azeites sujeitos a tratamentos térmicos;
- Possibilidade de explicação da decomposição térmica através da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e termogravimetria;
- Utilização de espectrometria de massa para identificação de compostos detetados por HPLC;
- Comparação entre azeites das diversas categorias (“azeites”, “azeites refinados”, etc.) relativamente ao seu desempenho sob condições de fritura;
- Tendo em consideração os parâmetros físico-químicos, realização de ensaios de análise sensorial das amostras, após tratamentos térmicos, com o intuito de saber se as alterações são perceptíveis ao consumidor;
- Análise da cor como modo de deteção de alterações.

REFERÊNCIAS

- Abramovic, H. e Klofutar, C. (1998) The temperature dependence of dynamic viscosity for some vegetable oils. *Acta Chim. Slov.* 45(1), 69-77
- AFGalimentar (2015) *Azeitona*. Acedido em Fevereiro 22, 2015 em: <http://www.afg.com.pt/alimentar/pages/display/olive-oil-regions/language:PT#blue-bar>
- Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J.J., Uceda, M. e Beltrán, G. (2007) How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9646–9654
- Andrikopoulos, N.K., Dedoussis, G.V.Z., Tzamtzis, V., Chiou, A. e Boskou, G. (2002) Evaluation of medium polarity materials isolated from fried edible oils by RP-HPLC. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 110-115
- AOCS (1995) *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. (4.ª Edição). Champaign, Estados Unidos da América
- ASAE (2014) *Riscos e alimentos - óleos e azeites*. (n.º 7). Consultado em Novembro 2, 2014, em: <http://www.asae.pt/?cr=11732>
- Ashrafi, N. (2012) Effects of temperature on rheology of olive oils. *Applied Rheology*. 22(3), 34203
- Barros, A.I., Freire, I., Gonçalves, B., Bacelar, E., Gomes, S., Lopes, J., Guedes-Pinto, H. e Martins-Lopes, P. (2013) Evaluation of chemical and phenotypic changes in Blanqueta, Cobrançosa, and Galega during olive fruits ripening. *Journal of Food*. 11(2), 136-141
- Belitz, H.D., Grosch, W. e Schieberle, P. (2009) *Food chemistry*. (4.ª Edição). Leipzig, Alemanha: Springer
- Bellingham & Stanley, Ltd. (2013) *Abbe 60 User Guide*. Reino Unido
- Beltrán, G., Rio, C., Sánchez, S. e Martínez, A. (2004) Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3434-3440
- Beltrán, G., Ruano, M.T., Jiménez, A., Uceda, M. e Aguilera, M.P. (2007) Evaluation of virgin olive oil bitterness by total phenol content analysis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 193–197
- Benedito, J., Mulet, A., Velasco, J. e Dobarganes, M.C. (2002) Ultrasonic assessment of oil quality during frying. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4531-4536
- Bester, E., Butinar, B., Bucar-Miklavcic, M. e Golob, T. (2008) Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry* 108, 446–454
- Bonnet, JP., Devesvre, L., Artaud, J. e Moulin, P. (2011) Dynamic viscosity of olive oil as a function of composition and temperature: a first approach. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1019–1025
- Bourne, M.C. (2002) *Food texture and viscosity: concept and measurement*. (2.ª Edição). Geneva, Nova York: Academic Press

- Brock, J., Nogueira, M. R., Zakrzewski, C., Corazza, F., Corazza, M. L. e Oliveira, J.V. (2008) Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(3), 564-570
- Canciam, C. (2010) Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. *Publ.UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.* 16(1), 07-12
- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini M. e Parenti, A. (2000) Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry.* 71, 553–562
- Carapinha, P., Correia, A.C. e Ferreira-Dias, S. (2012) Avaliação da qualidade do azeite durante o processo de fritura. In *VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de Novembro de 2012*. Atas Portuguesas de Horticultura, n.º 21: 343-350
- Cardoso, L.G.V., Barcelos, M.F.P., Oliveira, A.F., Pereira, J.A.R., Abreu, W.C., Pimentel, F.A., Cardoso, M.G. e Pereira, M.C.A. (2010) Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias* 31(1), 127-136
- Casa do azeite - Associação do Azeite de Portugal (2014). Acedido em Novembro 10, 2014, em: <http://www.casadoazeite.pt/>
- Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B.P.P. e Pereira, J.A. (2010) Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2972–2979
- Chatzilazarou, A., Gortzi, O., Lalas, S., Zoidis, E. e Tsaknis, J. (2006) Physicochemical changes of olive oil and selected vegetable oils during frying. *Journal of Food Lipids* 13, 27–35
- Codex Alimentarius (2001) Codex standard for olive oil, virgin and refined, and for refined olive-pomace oil. *Codex Stan* 33. 8, 25-39
- CONFAGRI - Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal, CCRL (2009a) *Denominações de Azeite*. Acedido em Fevereiro 22, 2015 em: <http://www.confagri.pt/Azeite/Pages/Denominacoes.aspx>
- CONFAGRI - Confederação Nacional das Cooperativas Agrícolas e do Crédito Agrícola de Portugal, CCRL (2009b) *Variedades existentes em Portugal*. Acedido em Fevereiro 22, 2015 em: <http://www.confagri.pt/AZEITE/Pages/VariedadesdeOliveira.aspx>
- Costa, H.M.L.G. (2012) *Azeites aromatizados: estudo da influência do agente aromatizante na composição química e resistência à oxidação*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança, Portugal
- Coutelieris, F. e Kanavouras A. (2005) Use of the activation energy concept to estimate the quality reduction of packaged olive oil. *JAOCs.* 82(2), 119-123
- Dehghannejad, N., Hojjatoleslami, M., Gharachorloo, M. e Shariaty, M.A. (2013) The effect of deep heating on rheological behavior of edible vegetable oils. *Current Trends in Technology and Science.* 2(5), 2279–0535

- Dias, S.M.C. (2009) *Pasta de azeite versus azeite virgem extra*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal
- Dobarganes, M.C. e Márquez-Ruíz, G. (1998) Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. *Grasas y Aceites*. 49(3-4), 331-335
- DRAP Centro - Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, Ministério da Agricultura e do Mar (2002) Acedido em Novembro 2, 2014 em:
http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/fritura_alimentos.htm
- Estruch, R. e Salas-Salvadó, J. (2013) Towards an even healthier mediterranean diet [Versão electrónica]. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 1-4. Acedido em 13 de Fevereiro de 2014, em:
<http://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753%2813%2900204-4/abstract>
- Farmacopeia Portuguesa VII (2002) *Métodos Analíticos*. (7ª Edição). Portugal
- Fasina, O.O., Hallmanb, H., Craig-Schmidt, M., e Clementsa, C. (2006) Predicting temperature-dependence viscosity of vegetable oils from fatty acid composition. *JAOCS*. 83, 899–903
- Faustino, C., Bettencourt, A.F., Alfaia, A. e Pinheiro, L. (2015) Introducing students to rheological classification of foods, cosmetics, and pharmaceutical excipients using common viscous materials. *J. Chem. Educ.* 92, 936-939
- Fernandes, M.W.S., Falcão, H.A.S. e Almeida, S.G. (2010) Índice de peróxido e de acidez em óleos de fritura de uma rede de fast food do Distrito Federal. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*. 13(16), 9-20
- Fischer, P. e Windhab, E.J. (2011) Rheology of food materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 16, 36–40
- Fischer, P., Pollard, M., Erni, P., Marti, I. e Padar, S. (2009) Rheological approaches to food systems. *C. R. Physique*. 10, 740–750
- Freire, P.C.M., Mancini-Filho, J. e Ferreira, T.A.P.C. (2013) Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. *Rev. Nutr.* 26(3), 353-368
- Freitas, D.C.P. (2013) *Caracterização fenólica de azeites virgens provenientes da cultivar Galega Vulgar e validação do método por HPLC*. Relatório de projeto de dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária de Beja, Beja, Portugal
- FSSAI - Food Safety and Standards Authority of India (2012) *Manual of methods of analysis of food*. New Delhi, Índia
- Garcia, B., Magalhães, J., Fregapane, G., Salvador, M.D. e Paiva-Martins, F. (2012) Potential of selected Portuguese cultivars for the production of high quality monovarietal virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 1070–1082
- Gertz, C., Aladedunye, F. e Matthäus, B. (2014) Oxidation and structural decomposition of fats and oils at elevated temperatures. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 0000–0000

- Giap, S.G.E. (2010) The hidden property of arrhenius-type relationship: viscosity as a function of temperature. *Journal of Physical Science*. 21(1), 29–39
- Giap, S.G.E., Nik, W.M.N.W., Ahmad, M.F. e Amran, A. (2009) The assessment of rheological model reliability in lubricating behaviour of vegetable oils. *Engineering e-Transaction*. 4(2), 81-89
- Gila, A., Jiménez, A., Beltrán, G. e Romero, A. (2014) Correlation of fatty acid composition of virgin olive oil with thermal and physical properties. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 0000–0000
- Herdade de Vale de Arca (2015) *Azeite de Quinta Virgem Extra*. Acedido em Fevereiro 22, 2015 em: <http://www.valedearca.com/pt/farm-to-table/azeite-quinta-virgem-extra>
- Hrcirlik, K. e Fritsche, S. (2004) Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 540–549
- Hui, Y.H. (2006) *Handbook of food science, technology, and engineering – volume 1*. (1.ª Edição). Estados Unidos da América: CRC Press
- Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2007) *Portugal Agrícola 1980-2006*. Lisboa, Portugal
- Instituto Nacional de Estatística, I.P. (2013) *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa, Portugal
- International Olive Council (2015) Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 8. February
- ISO 660:1996/Amd.1:2003 (2003) *Animal and vegetable fats and oils - determination of acid value and acidity*. Suíça
- ISO 3960:2007 (2007) *Animal and vegetable fats and oils - determination of peroxide value - iodometric (visual) endpoint determination*. (4.ª Edição). Suíça
- IUPAC 2.101:1992 (1992) *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. (7ª Edição). Grã-Bretanha
- Kalogianni, E.P., Karapantsios, T.D. e Miller, R. (2011) Effect of repeated frying on the viscosity, density and dynamic interfacial tension of palm and olive oil. *Journal of Food Engineering*. 105, 169–179
- Kim, J., Kim, D.N., Lee, S.H., Yoo, S.H. e Lee, S. (2010) Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behavior and oil uptake. *Food Chemistry* 118, 398–402
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Zarrouk, M. e Fregapane, G. (2010) Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry*. 121, 171–177
- Martinez-Pineda, M., Ferrer-Mairal, A., Vercet, A. e Yagüe, C. (2011) Physicochemical characterization of changes in different vegetable oils (olive and sunflower) under several frying conditions. *CyTA – Journal of Food*. 9(4), 301–306
- Martínez-Yusta, A. e Guillén, M.D. (2014) Deep-frying food in extra virgin olive oil: A study by H nuclear magnetic resonance of the influence of food nature on the evolving composition of the frying medium. *Food Chemistry*. 150, 429–437

- Martins, J.N., Santos, D.C., Alexandrino, S.P.S., Oliveira, E.N.A. e Castellón, R.E.R. (2010) Obtenção e caracterização físico-química do extrato oleoso de alho roxo (*Allium sativum*). *Tecnol. & Ciên. Agropec.* 4(3), 01-04
- Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M. e Oliveira, B.P.P. (2007) Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry.* 102, 406–414
- Mello, L.D. e Pinheiro, M.F. (2012) Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. *Alim. Nutr.* 23(4), 537-548
- Mosca, L., De Marco, C., Visioli, F. e Cannella, c. (2000) Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J. Agric. Food Chem.* 48, 297-301
- Navarra, G., Cannas, M., D'Amico, M., Giacomazza, D., Militello, V., Vaccaro, L. e Leone, M. (2011) Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence. *Food Chemistry.* 126, 1226–1231
- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos* (3.ª Edição). São Paulo, Brasil
- Oliveira, A.F., Neto, J.V., Gonçalves, E.D., Villa, F. e Silva, L.F.O. (2010) Parâmetros físico-químicos dos primeiros azeites de oliva brasileiros extraídos em Maria da Fé, Minas Gerais. *Scientia Agraria, Curitiba.* 11(3), 255-261
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. e Bartsch, H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer.* 36, 1235-1247
- Pardo, J.E., Cuesta, M.A., Alvarruiz, A., Granell, J.D. e Álvarez-Ortí, M. (2011) Evaluation of potential and real qualities of virgin olive oil from the designation of origin (DO) "Aceite Montes de Alcaraz" (Albacete, Spain). *Food Chemistry.* 124, 1684–1690
- Pedrosa, S.S.S. (2010) *Análise dos componentes do azeite utilizando métodos quimiométricos*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre, Universidade de Aveiro, Departamento de Química, Aveiro, Portugal
- Peres, M.A., Baptista, P., Malheiro, R., Dias, L.G., Bento, A. e Pereira, J.A. (2011) Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 105, 65–73
- Peri, C. (2014) *The extra-virgin olive oil handbook*. (1.ª Edição). Oxford, Reino Unido: Wiley Blackwell
- PerkinElmer (2012) *Olive Oil Reference Book*. Consultado em Dezembro 1, 2014, em: http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/APP_Olive_Oil_Reference_Book.pdf
- Pinheiro, P.B.M. e Silva, J.C.G.E. (2005) Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L.. *Analytica Chimica Acta.* 544, 229–235
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. e Gordon, M. (2001) *Antioxidants in food - practical applications*. (1.ª Edição). Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited

- Quiles, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Gómez, J.A., Huertas, J.R. e Mataix, J. (2002) Role of Vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*. 76, 461–468
- Rios, H.C.S., Pereira, I.R.O. e Abreu, E.S. (2013) Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. *Revista Ciência & Saúde*. 6(2), 118-126
- Sánchez-Gimeno, A.C., Negueruela, A.I., Benito, M., Vercet, A. e Oria, R. (2008) Some physical changes in Bajo Aragón extra virgin olive oil during the frying process. *Food Chemistry*. 110, 654–658
- Sanibal, E.A.A. e Mancini-Filho, J. (2002) Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. *Food Ingred. South Am*. 18, 48-54
- Santos, C.S.P., Cruz, R., Cunha, S.C. e Casal, S. (2013) Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*. 54, 2016–2024
- Santos, J.C.O., Santos, I.M.G. e Souza, A.G. (2005) Effect of heating and cooling on rheological parameters of edible vegetable oils. *Journal of Food Engineering*. 67, 401–405
- Silva, L., Pinto, J., Carrola, J. e Paiva-Martins, F. (2010) Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*. 121, 1177–1187
- Singh, R.P. e Heldman, D.R. (2008) *Introduction to food engineering*. (4.ª Edição). China: Academic Press
- Sousa, C., Gouvinhas, I., Barreira, D., Carvalho, M.T., Vilela, A., Lopes, J., Martins-Lopes, P. e Barros, A.I. (2014) ‘Cobrançosa’ olive oil and drupe: chemical composition at two ripening stages. *J Am Oil Chem Soc*. 91, 599–611
- Tabilo-Munizaga, G. e Barbosa-Cánovas, G.V. (2005) Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*. 67, 147–156
- Tasioula-Margari, M. e Okogeri, O. (2001) Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*. 74, 377–383
- United States Pharmacopeia (2013) *Chemical Tests*. (36.ª Edição). Estados Unidos da América
- VIAZ (2014) *Azeites DOP “Denominação de Origem Protegida”*. Acedido em Novembro 10, 2014 em: <http://www.viaz.pt/asp/default.aspx?id=18>
- Zorro, A., Gomes, J., Pinto, P. e Rodrigues, A.L. (2012) Determinação da lipoperoxidação em óleo alimentar. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*. 5, 39-42

Decreto-Lei n.º 76/2010 de 24 de Junho. *Diário da República*, 1.ª Série, n.º 121. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

Portaria n.º 1135/95 de 15 de Setembro. *Diário da República*, 1.ª Série-B, n.º 214. Ministério da Agricultura, da Saúde e do Ambiente e Recursos Naturais. Lisboa

Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão, de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L248, 5 de Setembro de 1991

Regulamento (CE) n.º 1107/96 da Comissão, de 12 de Junho de 1996, relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17.º do Regulamento (CEE) n.º 2081/92 do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L148, 21 de Junho de 1996

Regulamento (CE) n.º 1513/2001 do Conselho, de 23 de Julho de 2001, que altera o Regulamento n.º 136/66/CEE, bem como o Regulamento (CE) n.º 1638/98, no que respeita à prorrogação do regime de ajuda e à estratégia em matéria de qualidade no sector do azeite. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L201, 26 de Julho de 2001

Regulamento (CE) n.º 708/2005 da Comissão, de 10 de Maio de 2005, que altera determinados elementos do caderno de especificações e obrigações de uma denominação de origem inscrita no anexo do Regulamento (CE) n.º 1107/96 (Azeites do Norte Alentejano) (DOP). *Jornal Oficial da União Europeia*, L119, 11 de Maio de 2005

Regulamento (CE) n.º 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L93, 31 de Março de 2006

Regulamento (CE) n.º 702/2007 da Comissão, de 21 de Junho de 2007, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L161, 22 de Junho de 2007

Regulamento de Execução (UE) n.º 299/2013 da Comissão, de 26 de Março de 2013, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L90, 28 de Março de 2013

Regulamento de Execução (UE) n.º 1348/2013 da Comissão, de 16 de Dezembro de 2013, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*, L338, 17 de Dezembro de 2013

Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de Dezembro de 2013, que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 103797/2001, (CE) n.º 1234/2007 do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L347, 20 de Dezembro de 2013