

# **Estudo do efeito da concentração inicial de fenóis totais no comportamento do azeite após aquecimento em micro-ondas**

**Rafaela Prata**

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

Orientado por

**Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira**

**Prof. Doutora Gláucia Cristina Moreira**

**Bragança  
2015**



*Aos meus pais*

*À minha irmã*

*Ao Pedro*



## **Agradecimentos**

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, sem as quais a realização desta investigação não teria sido possível.

Manifesto a minha gratidão ao Professor Doutor José Alberto Pereira, orientador deste trabalho, pelas suas críticas e conselhos, sobretudo pela confiança, pelo reconhecimento, pelo estímulo e pela ajuda na concretização deste sonho.

A Professora Doutora Aziza Kamal Genena, coordenadora do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela dedicação ao seu cargo. A minha co-orientadora Professora Doutora Gláucia Cristina Moreira pela simpatia, atenção e boa disposição. Agradeço em particular a todos os professores que tive ao longo da vida, principalmente aos professores da UTFPR, cujos ensinamentos me permitiram conduzir este trabalho.

A Professora Doutora Susana Casal, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por todo o suporte e ajuda prestada. A Rebeca Cruz e a Carina Pinho pela simpatia, e por toda a ajuda nas determinações laboratoriais.

As pessoas excecionais que tive o prazer em conhecer em Portugal: Ricardo Malheiro e Nuno Rodrigues agradeço sobretudo pela paciência, incentivo, boa disposição, pela boa energia transmitida, pelos conselhos e companhia, sobretudo pela amizade que cultivamos. Serei eternamente grata.

Aos verdadeiros amigos, que sempre me apoiaram na concretização deste sonho, sobretudo aos amigos que a UTFPR e o IPB me presentearam e aos velhos amigos.

Aos meus pais que apesar das dificuldades, sempre me permitiram sonhar, transmitindo amor e coragem para a realização do mesmo. A minha família, sobretudo aos meus avós.

A Deus.

**A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.**

*Paulo Coelho*



## Índice

Resumo .....	XIII
Abstract.....	XV
1. Introdução.....	3
2. Referencial teórico.....	7
2.1. O azeite e sua caracterização química.....	7
2.1.1. Fração saponificável.....	7
2.1.1.1. Ácidos gordos.....	7
2.1.1.2. Triglicerídeos.....	10
2.1.2. Fração insaponificável.....	11
2.1.2.1. Hidrocarbonetos .....	11
2.1.2.2. Tocoferóis e tocotrienóis .....	12
2.1.2.3. Compostos fenólicos .....	13
2.1.2.4. Fosfolípidos .....	14
2.1.2.5. Ceras .....	14
2.1.2.6. Pigmentos: clorofilas e carotenoides .....	15
2.1.2.7. Álcoois alifáticos .....	15
2.1.2.8. Esteróis .....	16
2.1.2.9. Compostos voláteis e aromáticos .....	17
2.2. A qualidade do azeite .....	18
2.2.1. Análise sensorial.....	18
2.2.2. Ácidos gordos livres .....	19
2.2.3. Índice de peróxido .....	19
2.2.4. Coeficientes de extinção K232 e K270 .....	20
2.3. Estabilidade oxidativa .....	21
2.3.1. Variáveis que influenciam na estabilidade oxidativa dos azeites.....	23
2.4. Propriedades bioativas dos azeites .....	24
2.5. O processamento culinário e seu efeito sobre os lipídeos.....	25
3. Material e métodos .....	33
3.1. Amostragem .....	33
3.2. Parâmetros de qualidade .....	33
3.2.1. Análise sensorial.....	33
3.2.2. Acidez.....	35
3.2.3. Índice de peróxido .....	36
3.3. Composição química de azeites .....	37
3.3.1. Composição em ácidos gordos .....	37
3.3.2. Composição em esteróis .....	37

3.3.3. Tocoferóis.....	38
3.3.4. Teor em esqualeno.....	39
3.3.5. Clorofilas e carotenoides .....	39
3.3.6. Composição em fenóis .....	40
3.3.6.1. Teor em fenóis totais .....	40
3.3.6.2. Teor em álcoois fenólicos.....	41
3.4. Propriedades físicas dos azeites .....	42
3.4.1. Cor.....	42
3.5. Atividade antioxidante .....	42
3.5.1. Atividade sequestradora do radical DPPH .....	42
3.6. Estabilidade oxidativa .....	43
3.7. Análise estatística.....	43
3.7.1. Análise de variância .....	43
3.7.2. Análise de regressão .....	44
4. Resultados e discussão.....	47
4.1. Parâmetros de qualidade .....	47
4.1.1. Análise sensorial.....	47
4.1.2. Acidez livre .....	52
4.1.3. Índice de peróxido .....	53
4.2. Efeito do aquecimento em micro-ondas na composição química de azeites .....	54
4.2.1. Composição em ácidos gordos .....	54
4.2.2. Composição em esteróis .....	58
4.2.3. Tocoferóis.....	61
4.2.4. Teor em esqualeno.....	64
4.2.5. Clorofilas e carotenoides .....	65
4.2.6. Compostos fenólicos .....	67
4.2.6.1. Teor em fenóis totais .....	67
4.2.6.2. Teor em álcoois fenólicos.....	69
4.3. Efeito do aquecimento em micro-ondas sobre as propriedades físicas dos azeites .	71
4.3.1. Cor.....	71
4.4. Atividade antioxidante .....	76
4.4.1. Atividade sequestradora do radical DPPH .....	76
4.5. Efeito do aquecimento em micro-ondas na estabilidade oxidativa de azeites .....	78
5. Conclusão.....	85
6. REFERÊNCIAS.....	87

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos ácidos gordos encontrados em maiores quantidades no azeite: (a), ácido oleico com uma dupla ligação em sua estrutura, representando o ácido gordo majoritário. (b), ácido palmítico é o ácido gordo saturado majoritário. (c), ácido oleico, representa o ácido gordo poliinsaturado encontrado majoritariamente nos azeites. ....	8
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da formação de um triglicérido.. ....	10
<b>Figura 3.</b> Etapa de iniciação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados. 21	
<b>Figura 4.</b> Etapa de propagação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados. <b>Fonte:</b> Adaptado de Frankel, 2012. ....	22
<b>Figura 5.</b> Etapa de terminação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados. <b>Fonte:</b> Adaptado de Frankel, 2012. ....	22
<b>Figura 6.</b> Esquema simplificado do caminho da radiação no micro-ondas e da absorção pelos alimentos em um forno micro-ondas doméstico. ....	27
<b>Figura 7.</b> Folha utilizada na avaliação sensorial dos diferentes azeites. ....	35
<b>Figura 8.</b> Resultado da análise sensorial dos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento em micro-ondas. ....	51
<b>Figura 9.</b> Mudanças ocorridas no índice de peróxido (mEq.O <sub>2</sub> /kg) em azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento por micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	54
<b>Figura 10.</b> Mudanças ocorridas na concentração de esqualeno (mg/100g) em azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento por micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	64
<b>Figura 11.</b> Mudanças ocorridas no teor de clorofilas (mg/kg) em azeites com diferentes concentrações de fenóis totais submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	65
<b>Figura 12.</b> Mudanças ocorridas no teor de carotenoides (mg/kg) em azeites com diferentes concentrações de fenóis totais submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas. ....	66
<b>Figura 13.</b> Efeito dos diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas na composição fenólica de azeites. ....	68
<b>Figura 14.</b> Concentração de hidroxitirosol (mg/kg) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	69
<b>Figura 15.</b> Concentração de tirosol (mg/kg) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	70
<b>Figura 16.</b> Diferença de cor ΔE (A) e índice de amarelidade (B) de azeites submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).. ....	74
<b>Figura 17.</b> Apresentação visual dos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas. Teor em fenóis (1000, 865, 600 e 400) é expresso em mg/kg de azeite. ....	75



## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.</b> Composição em ácidos gordos do azeite e os respectivos limites de variabilidade adotados pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015). .....	9
<b>Quadro 2.</b> Composição em esteróis e os respectivos limites de variabilidade adotados pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015). .....	17
<b>Quadro 3.</b> Classificação geral dos azeites com base em seu teor de ácidos gordos livres (acidez), expresso em % de ácido oleico segundo o Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015. ....	19
<b>Quadro 4.</b> Classificação geral dos azeites com base no seu índice de peróxidos expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por Kg de óleo .....	20
<b>Quadro 5.</b> Valores médios para o parâmetro sensorial com o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). .....	49
<b>Quadro 6.</b> Efeito do aquecimento de azeites virgens extra com diferentes teores iniciais de fenóis totais na composição em ácidos gordos, expressa em percentagem (média±desvio padrão; n = 3). ....	56
<b>Quadro 7.</b> Efeito do aquecimento em micro-ondas no conteúdo de esteróis individuais (%) e esteróis totais (mg/kg) de azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais (média±desvio padrão; n = 3). ....	60
<b>Quadro 8.</b> Efeito do aquecimento em micro-ondas no conteúdo em tocoferóis e de vitamina E total (mg/kg) de azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais (1000, 865, 600, 400 mg/kg) (média±desvio padrão; n = 3). .....	62
<b>Quadro 9.</b> Valores médios para a determinação da cor pelo modo CIELAB (L*, a* e b*) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	72
<b>Quadro 10.</b> Percentagem de inibição do radical livre DPPH• em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	77
<b>Quadro 11.</b> Estabilidade oxidativa (horas) de azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3). ....	79



## Resumo

O azeite é a principal fonte de gordura vegetal na dieta Mediterrânea, e pelas suas propriedades químicas, biológicas e sensoriais tem visto o seu consumo aumentar a nível mundial. Atualmente, e devido à grande pressão do estilo de vida moderno, o aumento de refeições rápidas com recurso a aquecimento em micro-ondas está em franca expansão. Neste trabalho estudou-se o comportamento de azeites virgens com teores de compostos fenólicos distintos (1000, 865, 600 e 400 mg/kg) quando sujeitos a aquecimento em micro-ondas ( $t = 0_{\text{min}}$ ;  $t = 1,5_{\text{min}}$ ;  $t = 3_{\text{min}}$ ;  $t = 5_{\text{min}}$ ;  $t = 10_{\text{min}}$  a 1200W) e avaliaram-se as alterações ocorridas ao nível dos parâmetros de qualidade, composição em ácidos gordos, esteróis totais, clorofilas e carotenoides, teor em esqualeno, conteúdo em tocoferóis teor em fenóis totais, tirosol e hidroxitirosol, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa.

O teor inicial do azeite em compostos fenólicos influenciou no comportamento destes quando aquecidos em micro-ondas. De uma maneira geral notou-se uma degradação dos parâmetros de qualidade com o aquecimento, sendo que nos azeites com teor superior em fenóis totais essa degradação não foi tão pronunciada. Ao nível da análise sensorial, a partir dos primeiros minutos de oxidação todos os azeites mostraram uma elevada degradação dos atributos positivos. No que respeita à resistência à oxidação verificou-se um efeito protetor superior nos azeites com maior teor em fenóis totais comparativamente aos azeites com teor mais reduzido.

Enquanto nos primeiros, ao fim de  $t = 10_{\text{min}}$ , se registou uma diminuição do tempo de indução em 28%, nos últimos a redução foi de 48%. Também nos teores em tirosol e hidroxitirosol a tendência foi semelhante, enquanto nos azeites com 1000 mg/kg houve uma redução de 52% no seu teor (de 259 para 123 mg/kg), nos azeites com 400 mg/kg a redução foi 65% (de 85 para 30 mg/kg). Também no conteúdo em tocoferóis a tendência foi similar apesar de menos pronunciada, ocorrendo uma redução de 65 e 79% com  $t = 10_{\text{min}}$  nos azeites com maior e menor teor em fenóis respetivamente. Adicionalmente observou-se uma redução significativa dos esteróis totais, atividade antioxidante e pigmentos.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos; aquecimento em micro-ondas, tocoferóis, qualidade, estabilidade.



## **Abstract**

The olive oil is the main source of vegetable fat in the Mediterranean diet, and due to its chemical, biological and sensorial properties the increase in olive oil consumption worldwide is being observed. Currently and due to the great pressure of the modern life-style, the increase of fast food with resource to microwave heating is in vast expansion. In this work was studied the behavior of virgin olive oils with different content in phenolic compounds (1000, 865, 600 and 400 mg/kg) when subjected to microwave heating ( $t = 0_{\text{min}}$ ;  $t = 1,5_{\text{min}}$ ;  $t = 3_{\text{min}}$ ;  $t = 5_{\text{min}}$ ;  $t = 10_{\text{min}}$  at 1200W) and were evaluated the changes occurred at quality parameters, fatty acids composition, total sterols, chlorophylls and carotenoids, squalene content, tocopherols content, total phenols content, tyrosol and hydroxytyrosol, antioxidant activity and oxidative stability.

The initial content of phenolic compounds in the olive oil inflicted in the behavior of the oils when submitted at microwave heating. In a general way it was noted a degradation in the quality parameters with heating, being observed that in the olive oils with higher content of total phenols the degradation was not so pronounced. At sensorial level, after the first minutes of oxidation all olive oils showed a higher degradation of positive attributes. Regarding the oxidative stability it was verified a protector effect in the olive oils with higher total phenols content comparatively to those with reduced content. While in the olive oils with high content of total phenols, at  $t = 10_{\text{min}}$ , was registered a reduction of 28% in the induction time, in the olive oils with lower content of total phenols the reduction was of 48%.

The tendency observed in tyrosol and hydroxytyrosol was similar, while in the olive oils of 1000 mg/kg there was a reduction of 52% in their content (from 259 to 123 mg/kg), in the olive oils with 400 mg/kg the reduction was of 65% (from 85 to 30 mg/kg). Also in tocopherols content the tendency was the same, besides less pronounced, occurred a reduction of 65 and 79% with  $t = 10_{\text{min}}$  in the olive oils with higher and lower total phenols content respectively. Additionally it was observed a significant reduction in total sterols, antioxidant activity and pigments content.

**Keywords:** phenolic compounds; microwave heating, tocopherols, quality, stability



# ***CAPÍTULO 1***

---

Introdução



## **1. Introdução**

O azeite é o óleo vegetal extraído da azeitona apenas por processos físicos. Originalmente limitado a regiões do mediterrâneo, o seu consumo vem sendo expandido para outros países como no Norte da Europa, Estados Unidos, Argentina, Chile, México e Austrália. Seus atributos sensoriais e seu potencial benéfico para a saúde contribuem para isso, pois, diferentemente de outros óleos, o azeite apresenta uma percentagem elevada de ácidos gordos monoinsaturados, além de outros componentes naturais como pigmentos, compostos fenólicos, voláteis, vitaminas e outros antioxidantes, que se mantêm intactos no óleo devido ao seu processo de extração (Casal et al., 2010; Dairi et al., 2015; Santos et al., 2013).

Após extração o azeite pode ser classificado em diferentes categorias comerciais de acordo com a sua qualidade, nomeadamente azeite virgem extra, azeite virgem e azeite lampante, este último não pode ser comercializado diretamente ao público sofrendo um processo de refinação. A classificação comercial é feita de acordo com os seus atributos sensoriais e parâmetros físico-químicos, como a acidez, índice de peróxidos e coeficientes de extinção específica no ultravioleta.

Como óleo vegetal, o azeite é muitas vezes incluído em preparações culinárias que afetam a sua qualidade e composição. As diferentes práticas culinárias, desde a fritura comum até o aquecimento em micro-ondas, juntamente com as condições de processamento, como o tempo, a temperatura e as quantidades de alimentos, podem modificar o perfil químico do azeite, sendo atingidos especialmente os compostos antioxidantes (Santos et al., 2013) levando a sua degradação. Alguns trabalhos demonstraram que estes compostos podem desempenhar um papel ativo na proteção do azeite contra processos de degradação, sendo a oxidação o processo mais comum.

Assim, de acordo com alguns autores (ex. Malheiro et al., 2012) os componentes bioativos que se encontram preservados no azeite virgem extra, para além dos efeitos benéficos para a saúde atuam como fatores retardadores do processo de degradação.

Destes, destacam-se os compostos fenólicos, principalmente oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol, os quais parecem ajudar a reduzir o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas por atuarem como fortes antioxidantes. Ainda, a presença destes compostos com atividade antioxidante contribuem para a estabilidade, valor nutricional e são responsáveis pelo sabor amargo e picante do referido óleo (Dairi et al., 2015).

Uma vez que a oxidação do óleo envolve radicais livres, o processo de aquecimento em micro-ondas pode acelerar todas as reações oxidativas a uma taxa superior a outros tratamentos térmicos, como por exemplo o aquecimento em forno convencional. A informação disponível sobre as consequências do aquecimento por micro-ondas sobre a composição e qualidade nutricional dos óleos é ainda escassa.

Apesar de alguns trabalhos apontarem para a facilidade de formação de radicais livres quando ácidos gordos são expostos à energia de micro-ondas, considerando-se que os danos sofridos a um produto durante o aquecimento são diretamente proporcionais à temperatura e ao tempo envolvido (Albi et al., 1997a; Albi et al., 1997b; Vadivambal & Jayas, 2010).

Assim, no presente trabalho pretendeu-se contribuir para o esclarecimento do papel dos fenóis totais do azeite, antioxidantes naturais com elevado poder antioxidante, no processo oxidativo de azeites virgens extra quando sujeitos a aquecimento. Para tal estudaram-se diferentes lotes de azeite com teores distintos de fenóis totais, e avaliou-se o seu comportamento em termos de algumas características de qualidade e composição, após diferentes períodos de aquecimento em micro-ondas.

## ***CAPÍTULO 2***

---

**Breve revisão sobre o tema**



## **2. Referencial teórico**

### **2.1. O azeite e sua caracterização química**

O azeite é um alimento altamente energético devido à presença de ácidos gordos. Estes são representados principalmente pelo ácido oleico que compõe o azeite em 68-81,5 % sendo considerado, portanto, uma gordura monoinsaturada. Além de seu alto valor energético, apresenta efeitos positivos sobre a saúde dos consumidores.

Pode dividir-se em duas frações sendo a majoritária (fração saponificável), variável entre 98,5% e 99,5%, formada essencialmente por triglicerídeos e, em menor amplitude, por ácidos gordos livres e outros glicerídeos parciais. A fração minoritária (fração insaponificável) contém uma grande variedade de compostos que satisfazem uma vasta gama de funções, sendo os principais responsáveis pela estabilidade do azeite e as suas características organolépticas. Representa em 0,5-1,5% o azeite em massa. Consiste em vários componentes como compostos orgânicos voláteis, fenóis, tocoferóis, pigmentos, esteróis, esqualeno, entre outros, que são responsáveis pelo sabor, estabilidade e propriedades nutricionais do azeite.

Os parâmetros de estabilidade são os que determinarão a qualidade comercial dos óleos no final do armazenamento ou prazo de validade (quando é engarrafado e distribuídos em supermercados ou retalhistas), mantendo ótima suas propriedades sensoriais (Pardo et al., 2007).

Normalmente, os componentes minoritários, perdem-se, durante os processos de refinação, não estando presentes nos azeites refinados (Boskou, 2011; Saba et al., 2005; Sánchez et al., 2009).

Fatores como a cultivar, o estado de maturação dos frutos, as condições agronômicas e características tecnológicas de produção variam a composição química do azeite.

#### **2.1.1. Fração saponificável**

##### **2.1.1.1. Ácidos gordos**

Os ácidos gordos consistem em cadeias que cujas moléculas possuem átomos de carbono (C), de hidrogénio (H) e de oxigénio (O). Apresentando em uma de suas extremidades um grupo carboxilo (-COOH) e na outra um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) não funcional. A classificação destes compostos é feita de acordo com o comprimento da

cadeia carbonada, o número, a posição e a configuração das duplas ligações (Guiné, 2011).

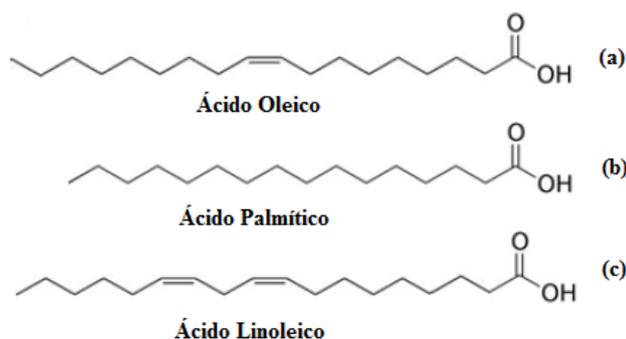
Podem ser saturados (quando não possuírem duplas ligações), ou insaturados (quando possuírem uma ou várias ligações duplas).

Possuindo uma dupla ligação na conformação *cis*, são classificados como monoinsaturados. Apresentando mais do que uma ligação dupla, são classificados como poliinsaturados.

De modo geral, diferenciam-se pelo número de átomos de carbono, que no caso do azeite variam entre 14 e 24, e pela quantidade de ligações duplas que possuem (entre 0 e 3) (Saldanha, 1999).

Os ácidos gordos encontrados majoritariamente nos azeites são o oleico ( $C_{18:1}$ ), palmítico ( $C_{16:0}$ ), linoleico ( $C_{18:2}$ ), esteárico ( $C_{18:0}$ ) e palmitoleico ( $C_{16:1}$ ). Os ácidos gordos linolénico ( $C_{18:3}$ ), araquídico ( $C_{20:0}$ ), eicosenóico ( $C_{20:1}$ ), margárico ( $C_{17:0}$ ), beénico ( $C_{22:0}$ ), lignocérico ( $C_{24:0}$ ), e mirístico ( $C_{14:0}$ ) existem, porém, em menores quantidades (Sánchez et al., 2009).

Os ácidos gordos majoritários presentes no azeite encontram-se esquematizados na Figura 1:



**Figura 1.** Estrutura dos ácidos gordos encontrados em maiores quantidades no azeite: (a), ácido oleico com uma dupla ligação em sua estrutura, representando o ácido gordo majoritário. (b), ácido palmítico é o ácido gordo saturado majoritário. (c), ácido oleico, representa o ácido gordo poliinsaturado encontrado majoritariamente nos azeites. **Fonte:** Adaptado de Sánchez et al., 2009.

Os azeites gregos, os italianos e os espanhóis possuem baixos teores em ácido linoleico e palmítico, possuindo uma elevada percentagem em ácido oleico. Azeites tunisianos por outro lado são ricos em ácido linoleico e ácido palmítico e pobres em ácido oleico. Com base na análise dos azeites de vários países, determinou-se uma classificação para os azeites: um com baixos teores de linoleico-palmítico e elevados

teores de ácido oleico; o outro com um elevado teor de ácido linoleico-palmítico e baixos teores de ácido oleico (Boskou, 2011).

No Quadro 1 são apresentados os principais ácidos gordos saturados e insaturados existentes no azeite e os respectivos limites de variabilidade imposta pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015). Em relação aos ácidos graxos *trans*, também se estabelece limites para cada categoria comercial. Para azeites virgens, por exemplo, os níveis de C18 : 1*t* e a soma dos isômeros C18:2*t* e C18:3*t* devem ser extremamente baixos (< 0,05 % em cada caso).

**Quadro 1.** Composição em ácidos gordos do azeite e os respectivos limites de variabilidade adotados pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015).

Categoria	Composição de ácidos gordos <sup>(a)</sup> (%)						Total dos isômeros <i>trans</i> oleicos (%)	Total dos isômeros <i>trans</i> -linoleicos + <i>trans</i> -linolénicos (%)
	C <sub>14:0</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>20:1</sub>	C <sub>22:0</sub>	C <sub>24:0</sub>		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05
2. Azeite virgem	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05
3. Azeite lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10
4. Azeite refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30
5. Azeite <sup>(b)</sup>	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35

(a) Teores de outros ácidos gordos (%): - palmítico: 7,50-20,00; - palmitoleico: 0,30-3,50; - heptadecanóico: ≤ 0,30; - heptadecenóico: ≤ 0,30; - esteárico: 0,50-5,00; - oleico: 55,00-83,00; - linoleico: 3,50-21,00; (b) Constituído por azeites refinados e azeites virgens.

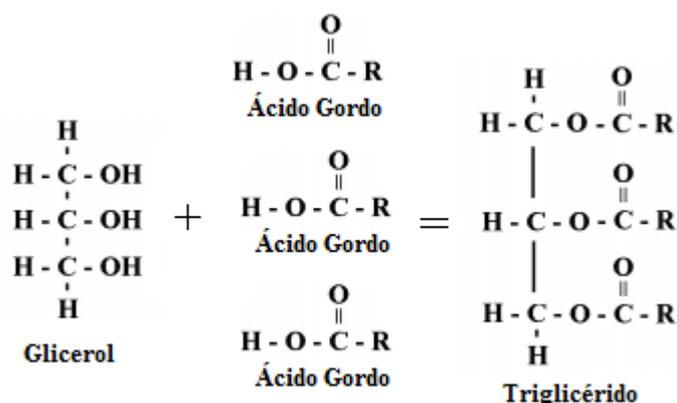
O principal ácido gordo do azeite é o ácido gordo monoinsaturado ω-9 oleico (55-83%), seguido dos ácidos gordos saturados palmíticos (7,50-20,0%), esteárico (0,5-5%), e do palmitoleico (0,3-3,5%) e dos ácidos gordos polinsaturados ω-6 linoleico (3,5-21,0%) e ω-3 linolénico (≤1,0%).

O número que vem após o ω, representa a posição da primeira ligação dupla, contando a partir do grupo metilo terminal da molécula (Guiné, 2011).

### 2.1.1.2. Triglicerídeos

Entre os constituintes da fração saponificável, encontram-se os triglicerídeos (componente principal do azeite, nas azeitonas e na maioria das plantas oleaginosas) que se acumulam na forma de distintas espécies moleculares de triacilgliceróis.

Os triglicerídeos são tri-ésteres derivados da união de uma molécula de glicerol (um tri-álcool) com três moléculas de ácidos gordos, onde os grupos hidroxila presentes no glicerol reagem com os ácidos carboxílicos dos ácidos gordos. Portanto, um triglicerídeo é formado por um conjunto de três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (Figura 2) (Sánchez et al., 2009).



**Figura 2.** Representação esquemática da formação de um triglicérido. **Fonte:** Adaptado de Sánchez et al., 2009.

A distribuição dos ácidos gordos no glicerol não é aleatória seguindo, portanto um padrão. Os ácidos gordos insaturados, geralmente são encontrados ligados na posição dois da molécula de glicerol, logo, o ácido linolênico, é mais favorecido em relação aos ácidos gordos como o oleico e linoleico, para ocupar esta posição do tri-álcool. A posição dois do glicerol é ocupada por ácidos gordos saturados quando a sua concentração total é muito elevada em relação aos ácidos gordos insaturados, não ocorrendo em azeites, pois, o azeite é um óleo vegetal que se diferencia de todos os outros devido ao seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados (Boskou, 2011).

Não há presente grande número de triglicéridos diferentes nos azeites, visto que determinadas distribuições dos ácidos gordos nas diferentes posições no glicerol nunca poderão ser encontradas ou são formados em quantidades mínimas. Triglicéridos totalmente saturados como o PPP (Palmítico-Palmítico-Palmítico), EEE (Esteárico-Esteárico-Esteárico), PEP (Palmítico-Esteárico-Palmítico), EPE (Esteárico-Palmítico-Esteárico), entre outros, nunca serão encontrados em azeite assim como os triglicéridos

triinsaturados contendo ácido linolénico, PoPoLn (Palmitoleico- Palmitoleico- Linolenico ) (Sánchez et al., 2009).

Os triglicéridos encontrados em maiores proporções nos azeites são o OOO (61,96%), POO (29,35%), OOL (4,05%), EOO (1,82%), POL (1,17%) e PPO/PLE (1,02%). Também são encontrados, porém, em menores concentrações o, PLL/POLn (0,20%), POE (0,16%), OLL/OOLn (0,14%), PPL/PELn (0,05%), LLL (0,01%), PPPo (0,01%) onde, P = palmítico, O = oleico, E = esteárico, L = linoleico e Ln = ácido linoleico (Boskou, 2011; Sánchez et al., 2009).

No azeite, além da maioria dos triglicéridos encontram-se presentes os glicéridos parciais. A biossíntese incompleta do triacilglicerol, bem como as reações de hidrólise dos triglicéridos devido à alteração do azeite, podem levar a formação destes compostos. Em azeite virgem, as concentrações de diglicéridos variam entre 1,0 e 2,8%, enquanto os monoglicéridos estão presentes em menos de 0,25%. (Boskou, 2011).

### **2.1.2. Fração insaponificável**

Os compostos minoritários compreendem mais de 300 compostos químicos diferentes, incluindo: hidrocarbonetos, fosfatídeos, esteróis, tocoferóis (vitamina E), vitaminas lipossolúveis (A, D e K), pigmentos (responsáveis pela cor verde: clorofila; e amarela: caroteno); voláteis (responsáveis pelo odor do azeite); e polifenóis (responsáveis pelo sabor amargo ou picante). Esses componentes são perdidos em grande parte durante o processo de refino (Guillén et al., 2009).

#### **2.1.2.1. Hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos encontrados no azeite podem ser de diversas naturezas: terpénicos, esteróides ou de policíclicos aromáticos.

Dois hidrocarbonetos terpénicos estão presentes em quantidades consideráveis no azeite, o esqualeno e o  $\beta$ -caroteno. O esqualeno (2,6,10,15,19,23- hexametil - 2,6,10,14,18,22 – tetracosahexaeno) é o principal constituinte da fração não saponificável (representa 90% da fração dos hidrocarbonetos). Sua concentração oscila entre 0,2 e 7,5 g / kg de azeite (ou mesmo em teores mais elevados, entre 0,8-12 g / kg de azeite) (Boskou, 2011; Guillén et al., 2009.).

O esqualeno, juntamente com os fitoesteróis (moléculas antioxidantes como os tocoferóis e outros compostos fenólicos), além da composição em ácido gordo, estão relacionados a efeitos benéficos na saúde humana devido a sua ação químiopreventiva

contra certos tipos de cancro devido ao consumo de azeites (Baccouri et al., 2007; Boskou, 2011).

Os hidrocarbonetos de natureza esteróica existem em pequenas quantidades no azeite ( $< 0,15$  mg/kg em azeites virgens), sendo que a sua presença é associada a processos de refinação, pois, durante este processo ocorre a desidratação dos esteróis, por ação do aquecimento. O composto mais significativo encontrado é o estigmasta -3,5 - dieno formado a partir do  $\beta$ -sitosterol. Este composto serve para demonstrar a presença de óleo refinado no azeite virgem (Sánchez et al., 2009).

Os hidrocarbonetos aromáticos presentes no azeite são, entre outros: naftaleno, fenantreno, fluoranteno, 1,2- benzoantraceno, criseno e perileno. São encontrados em pequenas quantidades que podem variar desde menos de 1  $\mu$ g/kg até 700  $\mu$ g/kg de azeite (Sánchez et al., 2009).

#### **2.1.2.2. Tocoferóis e tocotrienóis**

Os tocoferóis são os mais importantes fenóis lipofílicos encontrados e são compostos por um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral isoprenóide na posição 2, podendo contribuir para a estabilidade oxidativa dos azeites, no entanto a sua ação na resistência à oxidação não é evidente. Os tocotrienóis apresentam três insaturações na cadeia lateral, nas posições 3, 7, e 11, distinguindo-se assim dos tocoferóis (Cunha et al. 2006; Sánchez et al., 2009).

Estes compostos estão relacionados com a ação preventiva contra espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos, tais como plasma, membranas, e tecidos. A vitamina E é um nome coletivo que compreende quatro tocoferóis ( $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T, and  $\delta$ -T) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ -T<sub>3</sub>,  $\beta$ -T<sub>3</sub>,  $\gamma$ -T<sub>3</sub>, and  $\delta$ -T<sub>3</sub>), sendo que o  $\alpha$ -tocoferol representa 90 a 95% do total de vitamina E (Cunha et al. 2006; Sánchez et al., 2009)

Os níveis encontrados em mg de  $\alpha$ -tocoferol por kg de azeite dependerá de fatores como o potencial da cultivar e de fatores tecnológicos. As suas concentrações podem variar de 5 a 300 mg / Kg. Em um azeite de boa qualidade o conteúdo é geralmente entre 100 e 300 mg/ Kg de azeite. Em óleos comerciais com elevada acidez encontram-se valores abaixo de 5 mg/ Kg (Sánchez et al., 2009).

A Introdução de Boas Práticas de Fabricação e programas globais de controlo de qualidade apoiado pela União Europeia teve um impacto positivo nos níveis de tocoferóis em azeites virgens de diferentes origens (Boskou, 2011).

### **2.1.2.3. Compostos fenólicos**

A fração fenólica do azeite é uma mistura heterogénea de componentes presentes no mesocarpo das azeitonas, e não estão em qualquer outro óleo vegetal. Podem variar desde fenóis simples até estruturas muito complexas com um ou mais grupos hidroxilo, e podem ainda estar ligados a moléculas de açúcar, contudo, a estrutura de vários compostos fenólicos do azeite ainda não foi esclarecida. É considerada como uma parte importante do sistema químico de defesa do fruto, sendo atribuídas várias funções, entre as quais podemos citar a sua atividade antimicrobiana e proteção contra danos oxidativos, limitando os efeitos da luz UV. Os compostos fenólicos formam a fração polar e podem afetar a estabilidade e o sabor do azeite (contribuem para as propriedades organoléticas dos azeites virgens) (Guillén et al., 2001; Sánchez et al., 2009).

O azeite é também fonte de pelo menos 30 compostos fenólicos que contribuem para a resistência do azeite à oxidação. Verificou-se que existe uma relação linear entre o conteúdo fenólico e estabilidade oxidativa do azeite virgem extra (Tuck & Hayball, 2002).

O conteúdo em fenóis dependerá de inúmeros fatores, sendo principalmente dependente da produção e do tipo de armazenamento. O sistema de extração, a maturação do fruto, o processo de filtração e a cultivar também influenciam no conteúdo fenólico. A concentração em fenóis totais varia entre 50 e 200 mg de ácido cafeico/Kg de azeite, porém, encontram-se azeites com conteúdos próximos de 1g/kg de azeite (Sánchez et al., 2009; Tuck & Hayball, 2002).

Os polifenóis encontram-se divididos em diferentes categorias, tais como os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas (Tripoli et al., 2005).

O grupo dos ácidos fenólicos, foram os primeiros a serem descritos no azeite, e dividem-se em dois tipos – benzóico (ácido benzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido vanílico e ácido siríngico) e cinâmico (ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico) (Tripoli et al., 2005). Tatam-se de metabólitos secundários das plantas e estão presentes nos azeites em quantidade muito pequenas, inferiores a 1 mg/Kg de azeite (Sánchez et al., 2009).

Os álcoois fenólicos encontrados nos azeites são: hidroxitirosol o (3,4-dihidroxifenil) etanol, tirosol o (p-hidroxifenil) etanol e o (3,4- dihidroxifenil) etanol glucósido (Sánchez et al., 2009). O hidroxitirosol é um dos principais compostos fenólicos em azeitonas, azeite virgem e em águas residuais obtidas durante a produção de azeite. O hidroxitirosol é o composto fenólico que mais contribui para o aumento da resistência a oxidação (Sánchez et al., 2009; Tuck & Hayball, 2002).

Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra, e apresentam-se na forma dialdeídica do ácido decarboximetil elenólico ligado ao hidroxitirosol ou tirosol, isómeros das agliconas da oleuropeína (princípio amargo da azeitona encontrado no azeite) e ligstrosídeo. Estão presentes em quantidades de 27-32 mg/ kg de azeite. Se encontram apenas em plantas que pertencem a família *Oleaceae*, que incluem *Olea europea L*, procedendo do metabolismo secundário dos terpenos (Tuck & Hayball, 2002).

O principal glicosídeo presente no azeite é a oleuropeína. Quimicamente é um éster do ácido elenólico com o 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) (Sánchez et al., 2009; Servili et al., 2004).

Relativamente às lignanas, foram identificadas especificamente dois compostos, nomeadamente pinoresinol e acetoxipinoresinol. A quantidade de lignanas presentes no azeite virgem pode ser de até 100 mg/kg, mas, há variações consideráveis entre diferentes azeites (Servili et al., 2004). No azeite ainda podem ser encontradas diferentes tipos de flavonas, tais como apigenina ou luteolina (Guillén et al., 2001).

#### **2.1.2.4. Fosfolípidos**

Os principais fosfolípidos identificados no azeite são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina. O ácido oleico é o ácido gordo predominante na estrutura dos fosfolípidos, e o padrão de ácidos é semelhante a dos triglicéridos, uma vez que fosfolípido é o termo genérico que se refere a qualquer lípido que contenha um grupo fosfato. Em azeites pode-se encontrar pequenas quantidade de fosfolípidos, entre 40 e 135 mg/Kg (Boskou, 2011; Hatzakis et al., 2008; Sánchez et al., 2009).

#### **2.1.2.5. Ceras**

Ésteres de cera fazem parte da fração insaponificável em óleos vegetais e são do interesse para a indústria de transformação de azeite, pois, o conteúdo de ceras é

utilizado como parâmetro de qualidade para óleos de alta qualidade (Reiter & Lorbeer, 2001). A quantidade máxima permitida em azeites virgem extra é de 150 mg/kg de azeite e esse valor pode chegar a 350 mg/kg em azeites refinado e azeite (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015).

Observou-se diferenças no conteúdo de ceras em azeite de distintas variedades obtidas por sistema de pressão e centrifugação, onde, azeites obtidos por pressão, teve um ligeiro aumento no conteúdo de ceras (Sánchez et al., 2009).

As principais ceras detectadas em azeite têm números de carbono par, ou seja, são os ésteres de ácido oleico ou palmítico de C36 a C46 átomos de carbono (Reiter & Lorbeer, 2001).

#### **2.1.2.6. Pigmentos: clorofilas e carotenoides**

A cor do azeite pode variar de verde (escuro ou claro) a dourado ou amarelo, e é considerado um importante parâmetro de qualidade. Estas cores dependem do conteúdo em pigmento presente, da variedade e do grau de amadurecimento dos frutos. Os pigmentos estão envolvidas nos mecanismos de auto-oxidação e foto-oxidação. Desempenham um importante papel na estabilidade oxidativa do azeite virgem devido ao seu poder antioxidante natural na ausência de luz, e atividade pró-oxidante na presença de luz (Sánchez et al., 2009; Youssef et al., 2010).

As clorofilas a e b e os seus produtos de oxidação, feofitinas a e b, são responsáveis pela cor esverdeada. Os carotenóides (luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina e neoxantina), quimicamente chamados de terpenos são derivados do ácido mevalónico, e são responsáveis pela cor amarelada dos azeites e sua concentração varia entre 1 e 20 mg/kg. Os principais carotenoides presentes no azeite são luteína e  $\beta$ -caroteno (Boskou, 2011; Morelló et al., 2004; Sánchez et al., 2009).

Carotenoides e, em particular,  $\beta$ -caroteno são eficientes antioxidantes devido à sua capacidade para extinguir espécies de oxigênio radicais, e eles também podem agir como uma barreira de luz evitando a foto-oxidação (Morelló et al., 2004).

#### **2.1.2.7 Álcoois alifáticos**

Os álcoois alifáticos podem ser lineares (alifático) ou triterpénicos, sendo constituintes importantes, pois, podem ser utilizados para diferenciar diferentes tipos óleos (Sánchez et al., 2009).

Os álcoois alifáticos são precursores da formação de ceras, logo, um alto conteúdo em álcoois, poderia trazer como consequência, um aumento no conteúdo em ceras com o tempo. Os dois dos principais álcoois triterpênicos identificados são os diálcoois triterpênicos eritrodiol e uvaol. Suas concentrações variam de 500 a 3000 mg/kg de azeite e sua quantificação é importante, pois, os teores de eritrodiol e uvaol são usados como parâmetros de qualidade. Um elevado teor destes diálcoois triterpênicos é um indicativo de azeites obtidos por solventes (Ramírez-Tortosa et al., 2006). Segundo o Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015, o teor de Eritrodiol e uvaol para azeite virgem extra deve ser  $\leq 4,5$  %.

#### **2.1.2.8. Esteróis**

Os esteróis são álcoois tetracíclicos biossintetizados a partir do esqualeno (Ramírez-Tortosa et al., 2006). Estão presentes no azeite como álcoois livres e como ésteres de ácidos gordos. O principal esterol presente no azeite é o  $\beta$ -sitosterol (75-90% do total de esteróis), em menores quantidades encontram-se o estigmasterol, colesterol, 24-metileno-colesterol,  $\Delta^7$ -campesterol,  $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol,  $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol,  $\Delta^7$ -estigmasterol e  $\Delta^7$ -avenasterol (Guillén et al., 2009; Ramírez-Tortosa et al., 2006; Sánchez et al., 2009).

O Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015 estabelece os limites para a composição esterólica dos azeites.

Na Quadro 2 são apresentados os principais esteróis existentes no azeite e os respectivos limites de variabilidade imposta pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015).

A quantidade de esteróis pode ser usada para identificar a origem e também a pureza de um azeite (Ramírez-Tortosa et al., 2006). Estudos sobre a composição esterólica mostram que  $\beta$ -sitosterol torna-se 75 a 90% da fração total em esteróis, enquanto  $\Delta^5$ -avenasterol normalmente varia entre 5% e 20% (Boskou, 2011).

**Quadro 2.** Composição em esteróis e os respectivos limites de variabilidade adotados pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015).

Categoria	Composição esterólica (%)						Esteróis totais (mg/kg)	Eritrodiol e uvaol (%)
	Colesterol	Brassicasterol	Camposterol	Estigmasterol	$\beta$ -Sitosterol <sup>(a)</sup>	$\Delta$ -7-estigmasterol		
1. Azeite virgem extra	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Azeite virgem	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Azeite lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 <sup>(b)</sup>
4. Azeite refinado	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Azeite <sup>(d)</sup>	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 <sup>(c)</sup>
7. Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(a)  $\beta$ -Sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + clerosterol +  $\beta$ -sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

(b) Os azeites cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados azeite lampante se o teor de álcoois alifáticos totais for inferior ou igual a 350 mg/kg ou se a percentagem de eritrodiol e uvaol for inferior ou igual a 3,5 %.

(c) Os óleos cujo teor de ceras esteja compreendido entre 300 mg/kg e 350 mg/kg são considerados óleo de bagaço de azeitona bruto se o teor de álcoois alifáticos totais for superior a 350 mg/kg e a percentagem de eritrodiol e uvaol for superior a 3,5 %.

(d) Constituído por azeites refinados e azeites virgens.

### 2.1.2.9. Compostos voláteis e aromáticos

O azeite apresenta um aroma particular e relação aos outros óleos alimentares devido a uma grande quantidade de compostos aromáticos. Estes são produzidos por ação de enzimas lipoxigenase ou álcool desidrogenase, que atuam durante o esmagamento dos frutos e se incorporam na fase líquida da pasta das azeitonas no processo de termobatedura, formando aldeídos e álcoois (Sánchez et al., 2009).

Aproximadamente 280 componentes são identificados na fração volátil de azeites virgens. Elas são hidrocarbonetos (mais de 80 compostos), álcoois (45), aldeídos (44), cetonas (26), ácidos (13), ésteres (55), éteres (5) derivados do furano (5), derivados de tiofeno (5), piranonas (1), tióis (1) e um composto de pirazina (Boskou, 2011).

## **2.2. A qualidade do azeite**

A qualidade é o grau em que um produto atende às necessidades e desejos dos consumidores. A qualidade do azeite dependerá das preferências do mercado, baseando-se na percepção frente ao aroma, a cor e o sabor, podendo mudar ao longo do tempo e da localização dos consumidores, sendo definida à partir de perspectivas comerciais, nutricionais ou organolépticas (Angerosa, 2000; Bremner, 2000).

O regulamento (CEE) nº 2568/91, de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015), define a qualidade do azeite, com base em parâmetros que incluem o conteúdo de ácidos gordos livres, índice de peróxido, UV específicas (coeficientes de extinção  $K_{232}$  e  $K_{270}$ ) e pontuação sensorial.

Há outros parâmetros que, apesar de não estarem incluídos nos regulamentos e normas, possuem um efeito importante na estabilidade e características sensoriais do azeite e por isso são muitas vezes utilizados e determinados, como é o caso dos polifenóis (Kalua et al., 2007).

### **2.2.1. Análise sensorial**

A qualidade sensorial de um alimento indica o seu nível de aceitação e palatabilidade por parte dos consumidores. É determinado por um conjunto de características positivas avaliadas através dos órgãos dos sentidos. A cor, o odor, o sabor e sensações táteis, influenciam diretamente o apetite e a aceitação dos alimentos (Angerosa, 2000; Carrasco-Pancorbo et al., 2009).

Em azeites virgem extra, fatores como a variedade, as técnicas de produção, a maturação dos frutos no momento da colheita, as características agroclimáticas do ano de produção, assim como as possíveis composições do azeite no momento do envase, fazem com que diversidade de característica sensoriais deste tipo de produto seja enorme (Carrasco-Pancorbo et al., 2009).

Particularmente em azeite, os atributos de qualidade que se podem detetar através dos órgãos sensoriais não são tão numerosos como em alimentos sólidos, onde pode-se atribuir atributos como tamanho, forma, sensações cinestésicas (resistente, fibroso e flexível, etc.), ainda, outros atributos como turbidez, viscosidade se podem medir facilmente com equipamentos adequados. Portanto, a cor, o cheiro, o sabor, e sensações de picante, adstringência são importantes na avaliação sensorial de azeites (Carrasco-Pancorbo et al., 2009).

O Regulamento (CE) nº 1833/2015 de 12 de Outubro de 2015, estabelece o procedimento de avaliação das características organoléticas.

O método descrito no regulamento só é aplicável aos azeites virgens e à classificação ou rotulagem dos mesmos em função da intensidade dos defeitos detetados e do frutado, determinada por um júri constituído por um grupo de provadores selecionados, treinados e supervisionados.

Os atributos mais comuns em azeite são o frutado, o amargo e o picante. Às vezes, o perfil sensorial básico de azeite virgem é alterado significativamente devido à presença de defeitos (a tulha, o ranço e o mofo) (Carrasco-Pancorbo et al., 2009).

### 2.2.2. Ácidos gordos livres

Os triglicéridos e diglicéridos são propensos à hidrólise térmica, particularmente na presença de água, liberando ácidos gordos, aumentando consequentemente a acidez livre. Este parâmetro analítico é utilizado para avaliar a extensão da hidrólise. A hidrólise é influenciada pela temperatura, a interface entre o óleo e água, e a quantidade existente de água e vapor (Malheiro et al., 2011).

O teor de ácidos gordos livres e as características organoléticas são os métodos mais importantes para a classificação comercial de azeites (Quadro 3) (Kalua et al., 2007).

**Quadro 3.** Classificação geral dos azeites com base em seu teor de ácidos gordos livres (acidez), expresso em % de ácido oleico segundo o Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015.

Classificação do Azeite	Limite Acidez (em % de ácido oleico)
Azeite virgem extra	≤ 0,8
Azeite virgem	≤ 2,0
Azeite lampante	> 2,0
Azeite refinado	≤ 0,3
Azeite <sup>(a)</sup>	≤ 1,0
Óleo de bagaço de azeitona bruto	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,3
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,0

(a) Constituído por azeites refinados e azeites virgens.

### 2.2.3. Índice de peróxido

O índice de peróxidos (IP) é utilizado como um indicador de qualidade do azeite, visto que está relacionado com a oxidação inicial e formação de ranço e é medido em termos de mEq O<sub>2</sub>/kg de azeite.

O Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015 estabelece limites para o índice de peróxido (Quadro 4).

**Quadro 4.** Classificação geral dos azeites com base no seu índice de peróxidos expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por Kg de óleo

Classificação do Azeite	Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg)
Azeite virgem extra	≤ 20
Azeite virgem	≤ 20
Azeite lampante	-
Azeite refinado	≤ 5
Azeite <sup>(a)</sup>	≤ 1,0
Óleo de bagaço de azeitona bruto	-
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,3
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 1,0

(a) Constituído por azeites refinados e azeites virgens.

### 2.2.4. Coeficientes de extinção K232 e K270

A análise no espectrofotômetro UV pode fornecer uma série de informações sobre a qualidade do azeite, como o seu estado de conservação e possíveis mudanças ocorridas durante o processo tecnológico. A caracterização do azeite, a absorção a 232 nm e 270 nm são de especial importância, pois, nos fornecem informações sobre o estado oxidativo e permitem distinguir categorias de azeites virgens (Malheiro et al., 2011).

Os produtos de oxidação absorvem na região de 270 nm, e sua presença é geralmente indicativo de extensa oxidação ou de alto estresse térmico, como ocorre durante a refinação de óleo vegetal, logo, azeites virgens de boa qualidade e que são armazenados em condições adequadas contém valores baixos de absorção a 270 nm (Malheiro et al., 2011).

Segundo o Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015 os azeites virgem extra apresentam limites ≤ 2,50 para K232, ≤ 0,22 para K270 e ≤ 0,01 para ΔK. Quando os limites são ultrapassados, pode-se indicar a presença de azeite de qualidade inferior e que sofreram uma aceleração no processo de oxidação.

### 2.3. Estabilidade oxidativa

Os azeites virgens são conhecidos por serem mais resistentes à oxidação do que outros óleos alimentares por causa do seu teor de antioxidantes naturais e menores níveis de insaturações. Quanto maior o número de duplas ligações nos ácidos graxos, mais curto é o período de indução da auto-oxidação do óleo, além disso, os compostos fenólicos naturais presente nos azeites, são capazes de doar um átomo de hidrogénio para o radical lipídico formado durante a fase de propagação da oxidação lipídica (Cinquanta et al., 2001).

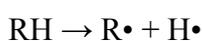
A oxidação lipídica foi reconhecida como o principal problema que pode afetar os óleos comestíveis e vários alimentos contendo gordura de qualidade durante o armazenamento. É a causa de importante deterioração, provocando mudanças em sua propriedade química, sensorial e nutricional (Paraskevopoulou et al., 2007; Velasco & Dobarganes, 2002).

Ela envolve a interação entre ácidos gordos insaturados e espécies reativas de oxigênio, podendo causar alterações nas características dos alimentos, tais como na aparência, no sabor, na textura, na vida de prateleira e o no perfil nutricional, além do desenvolvimento de sabor estranho e indesejável (Paraskevopoulou et al., 2007).

Os três principais processos envolvidos na oxidação do azeite são a auto-oxidação, a oxidação enzimática e a foto-oxidação.

O processo de auto-oxidação é uma reação direta que ocorre por espécies reativas de oxigênio ou os chamados radicais livres, com componentes orgânicos. Este processo frequentemente consiste em um complexa série de reações sequenciais, sendo descritas em termos de iniciação, propagação e terminação (Frankel, 2012).

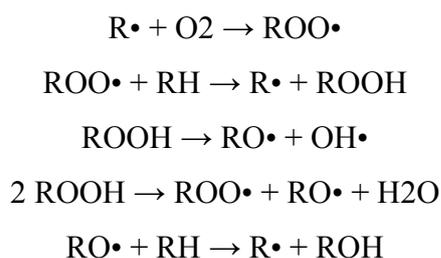
A etapa de iniciação (figura 3) surge quando os ácidos gordos insaturados (RH) perdem um átomo de hidrogénio instável (H), originando radicais livres (R•). Os radicais livres podem se formar por dissociação térmica direta (termólise), pela decomposição de hidroperóxidos, por catálise de metal e pela exposição à luz (fotólise), com ou sem a intervenção de fotossensibilizadores (Frankel, 2012; Velasco & Dobarganes, 2002).



**Figura 3.** Etapa de iniciação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.

**Fonte:** Adaptado de Frankel, 2012.

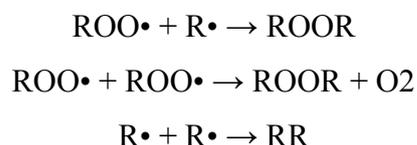
Durante a propagação, os radicais livres dos ácidos gordos reagem com o oxigénio molecular formando radicais peróxidos (ROO•). Estes radicais, reagem com novos ácidos gordos insaturados para produzir hidroperóxidos (ROOH) de natureza instável e outros radicais livres, desencadeando o mecanismo de propagação. Esta reação em cadeia acontece até se esgotarem os ácidos gordos insaturados ou até os radicais livres se inativarem uns aos outros, ou seja, alguns dos radicais lipídicos formados podem ser encerrados ao reagirem com outros radicais (figura 4) (Frankel, 2012; McClements & Decker, 2000).



**Figura 4.** Etapa de propagação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.

**Fonte:** Adaptado de Frankel, 2012.

A etapa de terminação é responsável pela formação dos produtos de oxidação secundária (produtos não radicais). É responsável pelo aparecimento de odores e sabores desagradáveis, ranço e cor amarelada (figura 5) (Frankel, 2012).



**Figura 5.** Etapa de terminação do processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.

**Fonte:** Adaptado de Frankel, 2012.

A oxidação normalmente prossegue lentamente na fase inicial e, em seguida, ocorre um aumento súbito na taxa de oxidação. O período de tempo que marca esta mudança na taxa de oxidação é o chamado período de indução ou tempo de indução (Velasco & Dobarganes, 2002).

A foto-oxidação ocorre quando o azeite está exposto a fonte de luz natural e/ou artificial, resultando numa mudança de cor e, por causa da formação de produtos de decomposição dos hidroperóxidos, desenvolve-se odor e sabor indesejáveis. Sua prevenção é de grande importância para garantir palatabilidade, economia e valor nutricional dos azeites (Psomiadou & Tsimidou, 2002).

A presença de enzimas promove a oxidação enzimática dos ácidos gordos insaturados, desenvolvendo alterações sensoriais.

### **2.3.1. Variáveis que influenciam na estabilidade oxidativa dos azeites**

O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigênio atmosférico, a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (ex. iões metálicos de transição) ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípidos.

É difícil diferenciar os efeitos individuais da temperatura e de oxigênio no processo de oxidação, pois, existe forte interações entre eles. A oxidação lipídica envolve a reação entre lipídios insaturados e oxigênio. O oxigênio é cerca de três vezes mais solúvel em óleos alimentares do que na água e por isso é provável que sempre haja oxigênio suficiente para desencadear oxidação lipídica, a menos que sejam tomadas medidas específicas para excluí-lo (McClements & Decker, 2000; Velasco & Dobarganes, 2002).

A química de oxidação em processos alimentares envolvendo altas temperaturas, como cozimento e fritura é muito mais complexo, já que que ambas as reações térmicas e oxidantes estão envolvidas simultaneamente. Com o aumento da temperatura, a solubilidade do oxigênio diminui drasticamente, porém, as reações de oxidação são aceleradas. Os radicais (R•) em relação aos radicais (ROO•) aumentam e compostos poliméricos são formados. Quando as temperaturas envolvidas são baixas ou moderadas (em pressão atmosféricas), a solubilidade do oxigênio é grande e, portanto, os radicais peróxidos, tornam-se os radicais mais comuns (ROO•) (Velasco & Dobarganes, 2002).

A formação de produtos de auto-oxidação durante o período de indução é lento a uma temperatura baixa (Choe & Min, 2006).

A luz é a terceira variável externa de grande influência na oxidação, pois, compostos minoritários como a clorofila podem ser excitados eletronicamente devido à absorção de luz. Esta molécula após ser excitada pode transferir o excesso de energia para uma molécula de oxigênio, dando origem a um oxigênio singlete. Este oxigênio reage 1.000 a 10000 vezes mais rápido do que o oxigênio normal, logo, a prevenção da fotoxidação durante o armazenamento é de grande importância para assegurar uma alta estabilidade oxidativa (Velasco & Dobarganes, 2002).

Os resultados obtidos por Caponio et al. (2005) sugerem que a vida de prateleira de óleos expostos a luz é mais curto do que o de óleos mantidos no escuro e que, depois de apenas 2 meses mantidos à luz, os óleos já não podiam ser classificados como virgem extra.

Com o aumento da temperatura a influência da luz sobre a oxidação torna-se progressivamente menos pronunciada, além disso, óleos submetidos a luz com comprimentos de onda mais curtos possuem mais efeitos prejudiciais do que quando submetidos à comprimentos de onda mais longos (Choe & Min, 2006; Velasco & Dobarganes, 2002).

Os óleos brutos contêm metais de transição, tais como ferro e o cobre, no entanto, o processo de refino reduz este conteúdo. O óleo de soja bruto por exemplo, contém aproximadamente 13,2 ppb e 2.80 ppm de cobre e ferro, respetivamente. Os metais podem aumentar a taxa de oxidação devido à redução da energia de ativação da etapa de iniciação da auto-oxidação, além disso, podem reagir diretamente com lípidos para produzir radicais (Choe & Min, 2006).

#### **2.4. Propriedades bioativas dos azeites**

Um menor taxa de mortalidade por causa de doenças cardiovasculares e certos tipos de cânceres em países mediterrâneos, em comparação com outras partes do mundo, sugere que o consumo de azeite fornece efeitos benéficos (Frankel, 2011).

Esta redução da incidência foi parcialmente atribuída à ingestão regular de azeite virgem como parte de uma dieta mediterrânea tradicional. O Consumo alimentar de azeite virgem em uma dieta mediterrânea normalmente varia entre 25-50 mL/dia (Cicerale et al., 2010).

Inicialmente, os efeitos benéficos à saúde através do consumo de azeite virgem eram atribuídos à fração de glicerol com o seu elevado concentração de ácidos gordos monoinsaturados, porém, verificou-se que em outros óleos de sementes, contendo também quantidades elevadas de ácidos gordos monoinsaturados, eram ineficientes em alterar os fatores de risco de doenças crônicas. Posteriormente, um grande número de investigações examinaram as ações biológicas de compostos fenólicos. Estes benefícios podem ser atribuídos a muitos antioxidantes fenólicos, principalmente o tirosol, o hidroxitirosol e seus derivados encontrados nos azeites (Cicerale et al., 2010; Frankel, 2011).

Os radicais livres são responsáveis por vários processos patológicos, tais como o cancro, e alterações celulares associadas ao envelhecimento. Felizmente, compostos denominados antioxidantes, rapidamente combatem estas espécies, inibindo o "stress" oxidativo. Portanto, antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar o desenvolvimento do processo de oxidação, bloqueando a formação de radicais livres, ou interagindo com estes, tomando-os inativos. Esses compostos neutralizam a oxidação de duas maneiras diferentes: mediante a proteção dos lípidos alvo da oxidação por iniciadores ou protelando a fase de propagação. No primeiro caso, os antioxidantes impedem preventivamente a formação dos radicais livres ou atuam na espécie responsável por iniciar a oxidação (Laguerre et al., 2007; Pellegrini et al., 2001).

Ainda, os compostos fenólicos encontrados em azeites possuem propriedades anti-microbianas podendo auxiliar na inibição do crescimento de microrganismos e atuar com agentes terapêuticos no tratamento de algumas doenças infecciosas. Cicerale et al. (2012) verificaram também que os compostos fenólicos derivados de azeite virgem extra possuem capacidade anti-inflamatória significativa.

## **2.5. O processamento culinário e seu efeito sobre os lipídios**

O azeite, semelhante a outros óleos vegetais, é utilizado para fritar, assar, cozinhar no micro-ondas entre outros processamentos culinários, sendo o micro-ondas usado cada vez mais em processamentos culinários quer a nível doméstico quer a nível industrial (Santos et al., 2013).

Os principais componentes dos alimentos como a água, os carboidratos, os lipídios, as proteínas e os minerais interagem de forma diferente ao serem aquecidos em micro-ondas. O efeito do aquecimento por micro-ondas sobre estes componentes, bem como as alterações de cor e sabor, têm sido extensivamente avaliada em vários alimentos. Tem-se dedicado um foco maior nos lipídios, uma vez que são propensos a sofrerem maiores degradações pela termo-oxidação. Estes lípidos incluem aqueles naturalmente presentes no alimento cru, mas principalmente os ingredientes adicionados de lipídios em refeições pré-preparadas ou os lipídios utilizados em processos culinários como na fritura (Malheiro et al. 2011).

Durante o aquecimento micro-ondas, assim como com outras tecnologias de aquecimento, ocorrem diferentes alterações químicas. Mudanças na composição do azeite após o processo térmico são esperadas. A natureza química dos ácidos gordos nos triacilgliceróis, em particular em seu grau de insaturação vai determinar a sua

suscetibilidade a oxidação e a polimerização, enquanto a presença de água irá acarretar em hidrólise. Outras degradações mais comuns incluem oxidação de esteróis, além de reações de Maillard com os componentes alimentares. Por outro lado outros componentes minoritários, como vitaminas protegem os óleos contra a oxidação e a polimerização, respectivamente. Há uma grande preocupação com relação aos novos compostos formados durante o aquecimento e seu possível impacto na saúde humana, pois, além do comprometimento da qualidade dos lipídeos, outros componentes potencialmente perigosos são formados. A temperatura alcançada durante o aquecimento de alimentos e o período de aquecimento irá determinar a extensão dos efeitos da degradação, ao comparar com outras tecnologias de aquecimento convencionais (Malheiro et al., 2011; Santos et al., 2013).

A aplicação de aquecimento em forno micro-ondas é um desenvolvimento mais recente do que outras técnicas tradicionais de processamento culinário, porém, esta tecnologia leva à perda de qualidade nutricional e à degradação dos óleos vegetais (Albi et al., 1997a).

O processo de aquecimento em micro-ondas pode acelerar reações de oxidações, pois, a temperatura é o fator mais importante que pode interferir no processo de oxidação lipídica, pois, o aquecimento em micro-ondas levará a um aumento substancial da temperatura dos óleos, uma vez que temperatura da fase de gordura aumenta duas vezes mais rápido durante o aquecimento por micro-ondas que a temperatura da água ou da água nos alimentos quando submetidos as mesmas condições de aquecimento (Mahmoud et al., 2009; Malheiro et al. 2009).

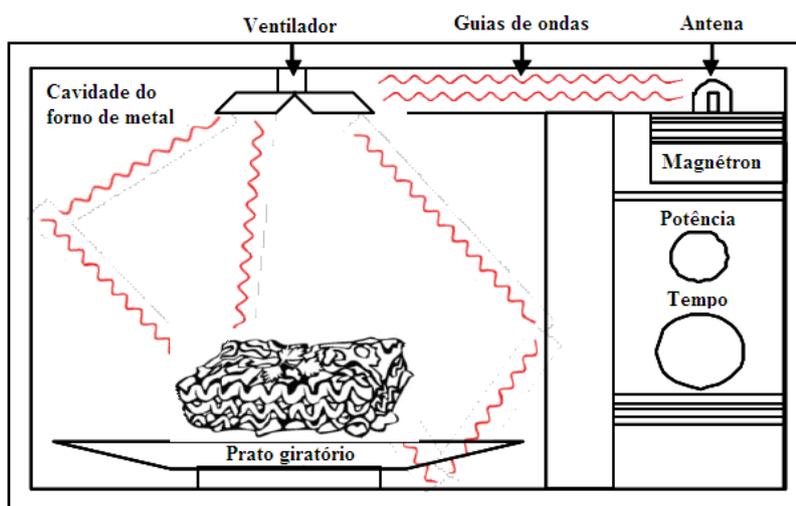
Cozinhar com micro-ondas tornou-se bastante comum devido as suas vantagens que inclui a capacidade para transmitir rapidamente o calor devido ao seu alto poder de penetração, conveniência, facilidade na utilização, e economia de tempo e energia. (Caponio et al., 2002; Caponio et al. 2003; Hassanein et al., 2003; Malheiro et al. 2009).

De um modo geral, a radiação de micro-ondas é o termo relacionado com qualquer radiação eletromagnética na gama de 300 MHz a 300 GHz. No entanto, fornos de micro-ondas domésticos e industriais geralmente operam a uma frequência de 2,45GHz, correspondendo a um comprimento de onda de 12,2 cm e energia de  $1,02 \times 10^{-5}$  eV. Essas micro-ondas são produzidas no interior do forno quando os elétrons em alta frequência ressoam em um tubo de elétrons denominado de magnétron (Jones et al.,

2002; Malheiro et al., 2011). Ímãs permanentes (compõem o magnétron) e são responsáveis pelo campo magnético.

O mecanismo fundamental de aquecimento por micro-ondas envolve agitação de moléculas polares ou íons que oscilam sob o efeito de um campo elétrico ou magnético oscilante, onde, as moléculas tentam orientar-se para estar em fase com o campo. Este campo elétrico é criado através de um cátodo interno e um ânodo externo que apresentam entre si uma grande diferença de potencial. Quando aquecido, o cátodo libera os elétrons, que viajam para fora em espiral, até o ânodo (Malheiro et al., 2011; Mutyala et al., 2010).

À medida que os elétrons passam nas câmaras de ressonância, a energia é liberada e é recebida como micro-ondas pela antena de saída. As micro-ondas são aplicadas à cavidade do forno, por meio de guias de onda, sendo posteriormente refletidas, distribuídas (por um ventilador divisor de feixe) e refletidas novamente pelas paredes metálicas, e absorvida pelos alimentos (figura 6) (Malheiro et al., 2011).



**Figura 6.** Esquema simplificado do caminho da radiação no micro-ondas e da absorção pelos alimentos em um forno micro-ondas doméstico.

**Fonte:** Adaptado de Malheiro et al., 2011.

Em comparação com técnicas convencionais de aquecimento, o aquecimento por micro-ondas tem como vantagens adicionais, elevadas taxas de aquecimento sem que se necessite contato direto entre a fonte de aquecimento e o material a ser aquecido, além de maior controle no processo de aquecimento ou de secagem, podendo também alcançar um aquecimento seletivo e tamanho reduzidos de equipamentos e resíduos, porém o aquecimento de alimentos por micro-ondas, assim como outras tecnologias,

apresentam também algumas desvantagens. Dependendo do teor de água e da sua distribuição no alimento, diferentes taxas de absorção de micro-ondas são criadas e o produto pode ser aquecido de forma desigual (Jones et al., 2002; Malheiro et al. 2011).

Segundo Mahmoud et al. (2009), o efeito de aquecimento por micro-ondas nos diferentes componentes dos alimentos podem modificar-se significativamente daqueles produzidos por aquecimento em forno convencional.

O aquecimento por micro-ondas é completamente diferente daquele que ocorre em um forno convencional (seja a gás ou elétrico), onde o aquecimento de alimentos ocorre por condução, irradiação e convecção para transportar o calor da fonte de aquecimento para o produto, o que exige relativamente um maior período de tempo, enquanto que o aquecimento por micro-ondas tem potencial para produzir calor instantaneamente devido a dissipação da energia vibracional das moléculas no alimento (El-Abassy et al., 2011; Vadivambal & Jayas, 2010).

O aquecimento convencional gera calor na superfície de contacto em primeiro lugar, e, em seguida, o calor difunde para dentro. Isso significa que existe um gradiente de temperatura a partir da superfície para o interior. No entanto, o aquecimento por micro-ondas gera calor no interior do material primeiro e, em seguida, aquece todo o conteúdo, ou seja, os próprios materiais absorvem energia, transformando-os em calor em seu interior (El-Abassy et al., 2011; Oghbaei & Mirzaee et al., 2010).

# ***CAPÍTULO 3***

---

## **Material e métodos**



### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Amostragem**

Para a concretização deste trabalho foram adquiridos vários lotes de azeite virgem extra a produtores que são conhecidos por produzirem azeites de qualidade. Estes lotes foram avaliados no que respeita ao seu teor em fenóis totais e verificados sensorialmente se correspondiam à categoria de azeite virgem extra (sem defeitos sensoriais e com mediana de frutado superior a zero). Após esta análise prévia, e de acordo com o seu teor em fenóis totais, foram criados quatro lotes de azeite, nomeadamente com 1000, 865, 600 e 400 mg de fenóis totais/kg de azeite, expressos em ácido cafeico. De cada lote foram constituídos três sub-lotes de aproximadamente 2L cada.

Para avaliar o efeito do teor em fenóis totais na qualidade e composição do azeite quando aquecido em micro-ondas, foram selecionados diferentes tempos de exposição, nomeadamente zero (sem aquecimento); 1,5; 3; 5; e 10 minutos, de forma a simular os aquecimentos realizados ao nível doméstico. Assim, para cada um dos sub-lotes, e para cada um dos tempos avaliados, foram colocados 50 mL de azeite numa placa de Petri (20 mm de altura e 110 mm de diâmetro), destapada, e que foram submetidas aos diferentes tempos de aquecimento. Foi utilizado um micro-ondas da marca SOLAC, na potência máxima (1200 Watts). O Azeite não aquecido foi utilizado como controle (correspondendo a 0 min). Posteriormente, as amostras foram mantidas em tubos de Falcon e refrigeradas até a análise. Cada uma das determinações foi efetuada em duplicata.

#### **3.2. Parâmetros de qualidade**

##### **3.2.1. Análise sensorial**

Os azeites foram submetidos à avaliação sensorial seguindo a metodologia adoptada pelo Conselho Oleícola Internacional (COI) nomeadamente o documento COI/T.20/Doc. nº 15/Rev.6 e COI/T.30/Doc. nº 17 e seguindo a folha de prova que se apresenta na Figura 7. Cada amostra foi submetida à prova por três membros de um painel treinado para avaliação sensorial de azeite, que classificou as amostras de acordo as sensações olfativas, gustativas-retronasais, e sensações olfato-gustativa. Para as sensações olfativas, os seguintes atributos foram medidos: frutado de azeitona- (0-7), outros frutos (0-3), verde (erva/folhas) (0-2), outras sensações positivas (0-3) e

harmonia (0-20). Em relação as sensações retronasal-gustativas, foram avaliados o sabor frutado de azeitona (0-10), doce (0-4), amargo (0-3), picante (0-3), verde (erva/folhas) (0-2), outras sensações positivas (0-3) e harmonia (0-20). A sensação final olfacto-gustativa também foi considerada para cada amostra, conjugando todas as sensações organolépticas, avaliando assim a complexidade (0-10) e persistência (0-10). Deve notar-se que a harmonia aumenta quando os atributos são equilibrados, e a complexidade aumenta com o número e intensidade de aromas e sabores. Embora as directrizes do COI recomendem o uso de 8 a 12 provadores para cada análise, neste trabalho apenas se utilizaram três provadores treinados, uma vez que por um lado a quantidade de amostra era limitada, e por outro devido à dificuldade de reunir um grande número de provadores treinados na região. Os elementos seleccionados têm integrado júris de vários concursos nacionais e internacionais, e que são provadores muito familiarizados com a classificação sensorial de azeites. Na elaboração do perfil sensorial, as amostras dos diferentes azeites em estudo foram avaliadas pelos provadores em duplicado.

### Folha de Avaliação Sensorial

Código da Amostra: \_\_\_\_\_ Proveedor: \_\_\_\_\_

#### Sensações olfativas (máximo 35 pontos)

Frutado de azeitona (0-7)

Outros frutos (0-3)

Verde (erva/folha) (0-2)

Outras sensações positivas (0-3)

Harmonia (0-20)

#### Sub-total (1)

#### Sensações gustativas-retronasais (máximo 45 pontos)

Frutado de azeitona (0-10)

Doce (0-4)

Amargo (0-3)

Picante (0-3)

Verde (erva/folha) (0-2)

Outras sensações positivas (0-3)

Harmonia (0-20)

#### Sub-total (2)

#### Sensação final olfato-gustativa (máximo 20 pontos)

Complexidade (0-10)

Persistência (0-10)

#### Sub-total (3)

**Nota Final (1+2+3)**

**Figura 7.** Folha utilizada na avaliação sensorial dos diferentes azeites.

### 3.2.2. Acidez

A determinação da acidez foi efetuada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. A toma de amostra para cada ensaio foi de  $\approx 3,0$  g, independentemente do índice de acidez presumido. Num

erlenmeyer dissolveram-se as tomas de azeite em 50 mL de uma solução (1:1) etanol/éter etílico e posteriormente foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador, uma solução de fenolftaleína, até o aparecimento da coloração carmim da fenolftaleína persistente durante 10 s. As amostras foram analisadas em duplicata. A acidez foi expressa em percentagem de ácido oleico livre na amostra, sendo determinada pela seguinte equação:

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

onde:

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

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

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

m - massa da amostra em grama.

### 3.2.3. Índice de peróxido

A análise do índice de peróxido foi determinada de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. Dissolveu-se independentemente do índice de peróxido presumido, a toma de amostra ( $\approx 1,20$  g) em 15 mL de ácido acético glacial e 10 mL de clorofórmio juntamente com 1 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio. Após a dissolução tapou-se o erlenmeyer e o armazenou a temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 5 minutos. Por último, acrescentou-se 75 mL de água destilada e uma solução de cozimento de amido (1g/100mL) como indicador e titulando o iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N. As amostras foram analisadas em duplicata, sendo o índice de peróxido calculado através da seguinte fórmula:

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

onde:

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

N - normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio;

m - massa da amostra em grama.

### **3.3. Composição química de azeites**

#### **3.3.1. Composição em ácidos gordos**

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. Os ácidos gordos, assim como os seus ésteres metílicos, foram avaliados recorrendo à transesterificação direta a frio e extração. A toma de duas gotas de amostra foi dissolvida em 2 mL de n-heptano, 100 µL de padrão interno Triundecanoína (Supelco) (20 mg/mL preparado em n-heptano), 200 µL de hidróxido de potássio preparado em metanol e fosfato de sódio.

O perfil em ácidos gordos foi determinado em um cromatógrafo gasoso (GLC) Chrompack, modelo CP-9001, sistema injetor split-splitless, com detector de ionização por chama (FID), automático modelo Chrompack CP-9050 e uma coluna de sílica fundida com fase estacionária CP-Sil 88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25 x 0,19 µm. O gás de arrasto utilizado foi o hélio com uma pressão de 110 kPa. As temperaturas do detector e do injetor eram de 250 °C e 230 °C, respectivamente, com uma relação de split de 1:50 e um volume de injeção de 1 µL.

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

#### **3.3.2. Composição em esteróis**

A determinação dos esteróis foi realizada a partir de uma adaptação do regulamento (CEE) nº 2568/91, de 11 de Julho de 1991 e posteriores alterações (Regulamento (CE) nº 1348/2013 de 16 de dezembro de 2013). Em um vial de 22 mL adicionou-se 50 µL de uma solução de deidrocolesterol (2,06 mg/mL em acetato de etilo; padrão interno adquirido de Sigma, Alemanha), onde posteriormente foi evaporado em um bloco de aquecimento a 30 °C, em corrente de azoto. Uma toma de amostra de ≈ 0,5 g de azeite juntamente com 5 mL de hidróxido de potássio 2M, foi adicionado a este padrão interno evaporado e levado em estufa durante 40 minutos a 80 °C. Após, foi adicionado 5 mL de água, e efetuou-se sucessivas lavagens com 6 mL de éter dietílico (3 vezes) e 5 mL de água (5 vezes). Eliminaram-se resíduos de água com

sulfato de sódio anidro e evaporou-se em bloco de aquecimento. Aproximadamente 1 mL dessa solução foi levada a estufa (100 °C, durante 15 minutos).

Tratou-se previamente as placas de gel de sílica com hidróxido de potássio etanóico (0,2 mol/L). Mergulhou-se as placas a cerca de 4 cm dessa solução durante 10 s, e deixou-se secar.

Após, adicionou-se 250 µL de acetato de etilo e o extrato obtido foi aplicado sobre a placa de TLC juntamente com 5 µL de padrão interno de colesterol (0,8%).

Esta placa foi levada para uma câmara previamente saturada com 150 mL de uma solução de resolução n-hexano/éter dietílico (65:35 v/v) sendo posteriormente pulverizada com uma solução de diclorofluoresceína (2,7-diclorofluoresceína,) à 0,2 % observando-se as bandas posteriormente.

Raspou-se a fração esterólica das placas e extraiu-se os compostos da sílica com 5 mL de acetato de etilo quente, sendo adicionado posteriormente 20 µL de betulina (0,2%) e 500 µL de acetona. Evaporou-se em bloco de aquecimento a 30 °C em corrente de azoto.

A derivatização ocorreu com a adição de 100 µL de reagente derivatizante (*N,O*-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida em 1% de trimetilclorosilano/Piridina (1:1 v/v) a 80 °C durante 15 minutos.

As amostras foram analisadas por GC - FID Thermo Finnigan (Milão, Itália) utilizando uma coluna DB - 5MS (30 m 0,25 milímetros que 0,25 mm; J & W Scientific, EUA), com um programa de temperatura de 250 a 300 °C. O gás de arraste utilizado é o Hélio (Gasin, Portugal) a uma pressão interna 100 kPa, sendo o volume de injeção de 0,8 µL.

O programa de análise utilizado foi o Chrom-Card Trace-Focus GC e os resultados foram expressos de acordo com a legislação vigente.

### **3.3.3. Tocoferóis**

A concentração de vitamina E foi obtida por determinação do teor de tocoferóis por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), segundo a norma ISO 9936:2006, com algumas modificações descritas por Casal et al. (2010).

Em uma toma de amostra de  $\approx$  100 mg, adicionou-se 10 µL de 2-Metil-2-(4,8,12-trimetilrیدecil)-croman-6-ol (tocol) (Matreya Inc., USA) e perpez-se o volume até 1 mL com n-hexano. O padrão de tocoferóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -) foi adquirido de Supelco (USA).

O cromatógrafo consistia num sistema integrado Jasco (Japão) com bomba modelo Jasco PU-1580 (Japão), amostrador automático refrigerado (Jasco AS-2057 Plus, Japão), desgaseificador Jasco DG-2080-53 (Japão), e um detector de Fluorescência (Jasco FP-2020 Plus, Japão), programado para ser excitado a 290 nm e emitir a 330 nm.

A separação cromatográfica foi conseguida através de uma coluna Supelcosil™ (LC-SI; 75 cm × 3,0 mm; 3 µm) (Sigma-Aldrich, Alemanha), operando à temperatura constante de 22 ± 2°C. O sistema isocrático era composto por uma fase móvel, com uma mistura de 1,4-dioxano em n-hexano (2,5%, v/v) num caudal de 0,70 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL.

Os dados foram analisados com o controle ChromNAV Center, Jasco Chromatography Data Station (Japão), sendo os resultados expressos em mg/ Kg de azeite.

#### **3.3.4. Teor em esqualeno**

O esqualeno foi analisado em simultâneo com os ácidos gordos, de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991.

O perfil em ácidos gordos foi determinado em um cromatógrafo gasoso (GLC) Chrompack, modelo CP-9001, sistema injetor split-splitless, com detector de ionização por chama (FID), automático modelo Chrompack CP-9050 e uma coluna de sílica fundida com fase estacionária CP-Sil 88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50 m x 0,25 x 0,19 µm. O gás de arrasto utilizado foi o Hélio com uma pressão de 110 kPa. As temperaturas do detector e do injetor eram de 250 °C e 230 °C, respectivamente, com uma relação de split de 1:50 e um volume de injeção de 1 µL.

Uma amostra controle (Olive oil 47118, Supelco) e uma mistura padrão de éster metílico de ácido gordo (Supelco 37 FAME Mix) foram utilizadas para identificação e calibração (Sigma-Aldrich®, Espanha).

O resultado será expresso em mg de esqualeno/100g de azeite.

#### **3.3.5. Clorofilas e carotenoides**

As amostras foram preparadas de acordo com Minguez-Mosquera et al., 1991. A fracção de clorofila a 670 nm e a fracção de carotenóides a 470 nm foram avaliadas a

partir do espectro de absorção de cada amostra de azeite virgem (0,15 g) dissolvido em ciclo-hexano (1 mL). Os coeficientes de extinção aplicados foram  $E_0 = 613$  para feofitina como o componente principal na fracção das clorofilas e  $E_0 = 2000$  para luteína como o principal componente dos carotenoides.

Assim, o conteúdo em pigmentos foi calculado através das expressões abaixo:

$$\text{Clorofila (mg/kg)} = (A_{670} \times 106)/(613 \times 100 \times d)$$
$$\text{Carotenoide (mg/kg)} = (A_{470} \times 106)/(2000 \times 100 \times d)$$

Em que,

$A$  é a absorbência; e

$d$  é a espessura da tina em centímetros.

### 3.3.6. Composição em fenóis

#### 3.3.6.1. Teor em fenóis totais

A composição em fenóis totais foi determinada pelo método utilizado por Capannesi et al. (2000), com algumas adaptações. Para a reta de calibração preparou-se uma solução mãe de ácido cafeico de concentração 2 mg/mL, onde as soluções padrão diluídas se encontravam num intervalo de concentrações de 0,04 a 0,18 mg/mL. Após preparação das soluções, adicionou-se em tubos de 10 mL, 1 mL dessa solução, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de uma solução de carbonato de sódio (7,5%), perfazendo-se o tubo com água deionizada. A mistura foi mantida sobre refrigeração durante a noite ( $\approx 12$  h). Após este período foi centrifugada e efetuou-se as leituras a  $\lambda = 765$  nm.

A toma de amostra de  $\approx 2,5$  g de azeite foi dissolvida em 2,5 mL de n-hexano e 2,5 mL de uma mistura de metanol/água (80:20 v/v), sendo posteriormente centrifugada durante 5 minutos à 5000 rpm.

Após a centrifugação retirou-se 1 mL de extrato, na qual foi adicionado 1 mL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de Carbonato de Sódio (7,5%) e 7 mL de água deionizada. A mistura foi refrigerada durante a noite ( $\approx 12$ h) e efetuou-se posteriormente as leituras num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ a  $\lambda = 765$  nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido cafeico/Kg de azeite.

### 3.3.6.2. Teor em álcoois fenólicos

A determinação de hidroxitrosol e tirosol por hidrólise ácida foi efetuada segundo o procedimento descrito por Romero & Brenes (2012), com algumas modificações descrita por Mulinacci et al. (2006). A toma de amostra de  $\approx 0,4$  g de azeite foi dissolvida em 2,0  $\mu\text{L}$  de padrão interno a 0,15 mg/mL e 2,5 mL de ácido clorídrico 2M, preparado em uma mistura de metanol/água (80:20 v/v).

O padrão interno utilizado foi o ácido siríngico (Sigma-Aldrich Alemanha), preparado previamente em metanol/água (80:20 v/v).

Esta mistura foi mantida em temperatura constante (25°C) durante 6 horas, sofrendo agitação em vortex de 30 em 30 minutos durante 30 segundos. Após, adicionou-se 2,5 mL de uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v). Filtrou-se o extrato hidrolisado, através de uma membrana filtrante descartável de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  (Tecnocroma, Espanha).

Todos os hidrolisados foram conservados à 4°C até o momento da sua análise por HPLC.

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

O cromatógrafo estava equipado com um detector de díodos MD-4010. A aquisição e tratamentos de dados foram adquiridos por ChromNAV Data System.

Na separação da fase cromatográfica, utilizou-se como eluentes uma solução aquosa 0,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (eluyente A) e 0,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em metanol/acetonitrila (50:50 v/v) (eluyente B), com o seguinte gradiente: 0 minuto: 96% de A; 2 minutos: 80% de A; 10 minutos: 50% de A; 12 minutos: 0% de A, mantidos durante 2 minutos; 16 minutos: 96% de A, durante 14 minutos à um fluxo de 0,45 mL/min.

A quantificação dos compostos fenólicos foi a 280 nm, sendo o teor de fenóis expresso em mg/kg de azeite.

### 3.4. Propriedades físicas dos azeites

#### 3.4.1. Cor

A determinação da cor dos azeites com ou sem nenhum tipo de aquecimento foi mensurada com a Konica Minolta model CR-400 colorimeter. As diferenças de cor ( $\Delta E$ ) entre as amostras de controlo, consideradas como padrão (sem aquecimento) e as amostras submetidas aos diferentes aquecimentos foram calculadas a partir das variáveis monocromáticas determinadas por  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , obtidos a partir do método CIELAB, bem como índice de amarelamento (YI) descrito por Zamora et al. (2004).

O valor de  $L^*$  representa a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), o valor  $a^*$  varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e o valor  $b^*$  varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo). As medições foram realizadas numa célula para líquidos, onde foram colocadas as amostras e foram lidas as coordenadas Cielab em triplicado, à temperatura ambiente e a um ângulo de  $0^\circ\text{C}$ .

Os resultados foram obtidos através das expressões abaixo:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$YI = \frac{142,86 \times b^*}{L^*}$$

### 3.5. Atividade antioxidante

#### 3.5.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

A avaliação da atividade sequestradora foi realizada pelo radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) segundo a metodologia descrita por Malheiro et al. (2012). Uma solução de  $\approx 1$  g de azeite em acetato de etilo (10%, m/v), foi adicionada de 4 mL de uma solução recém preparada de DPPH ( $1 \times 10^{-4}$  M em metanol) em um tubo de 15 mL. A mistura foi agitada vigorosamente durante 10 s e o tubo foi mantido no escuro durante 30 minutos. Efetuaram-se posteriormente as leituras num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ a  $\lambda = 515$  nm.

Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle

### **3.6. Estabilidade oxidativa**

A estabilidade à oxidação foi avaliada pelo método de condutividade (Rancimat 743, Methrom Ltd., Suíça), descrita por Malheiro et al. (2012). Fez-se borbulhar uma corrente de ar, filtrada, limpa e seca (20 L/h) através de uma toma de amostra (3,0 g) aquecida a  $120 \pm 1,6^\circ\text{C}$ . Os compostos de oxidação formados ao longo do tempo, mais polares que os triglicéridos, tais como hidroperóxidos, álcoois e compostos carbonílicos, são arrastados pelo fluxo de ar e borbulham posteriormente numa solução aquosa. Nesta solução está imerso um elétrodo que mede a sua condutividade automaticamente e continuamente.

Neste equipamento não é necessário o uso de solventes para a realização do método. Exige pouco espaço laboratorial, é um método um pouco moroso dependendo das amostras utilizadas no ensaio e permite o controlo individual de cada célula teste. O aparelho executa as análises automaticamente, terminado as análises das amostras apenas quando a condutividade medida aumenta bruscamente atingindo um máximo de  $300 \mu\text{S}/\text{cm}$ . O cálculo dos tempos de estabilidade das amostras analisadas é feito automaticamente pelo programa do aparelho. O cálculo é feito pelo traçado das tangentes à curva obtida no registador. O comprimento medido é o espaço compreendido entre o início da leitura e o ponto de interceção das tangentes à curva correspondendo ao chamado “período de indução”.

### **3.7. Análise estatística**

#### **3.7.1. Análise de variância**

De forma a avaliar a existência de diferenças estatísticas sobre os efeitos dos diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas e forno convencional nos azeites sobre os parâmetros de qualidade, composição química, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa dos azeites com diferentes teores iniciais de antioxidantes e se houve diferenças estatísticas entre as amostras sobre um mesmo tempo de aquecimento realizou-se análise estatística utilizando o software SPSS versão 20.0 (IBM Corporation, New York, EUA). Todas as variáveis dependentes foram analisadas para verificar a sua normalidade e homogeneidade da variância (Testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente). Quando observou-se homogeneidade de variâncias ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Levene, aplicou-se uma ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, uma vez que a igualdade de variâncias foi assumida. No caso de variáveis não homogêneas ( $P < 0,05$  pelo teste de Levene), aplicou-se ANOVA de Welch e as

médias foram comparadas pelo teste Dunnett T3's, uma vez que a igualdade de variâncias não foi assumida.

### **3.7.2. Análise de regressão**

A análise de regressão, usando o Excel da Microsoft Corporation, foi estabelecida entre os tempos de aquecimento em micro-ondas e forno convencional, sobre os parâmetros de qualidade, composição química, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa dos azeites com diferentes teores iniciais de antioxidantes.

# ***CAPÍTULO 4***

---

## **Resultados e discussão**



## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Parâmetros de qualidade

#### 4.1.1. Análise sensorial

A avaliação sensorial é um dos parâmetros obrigatórios para a classificação comercial de azeites virgens. As características sensoriais que os azeites apresentam encontram-se relacionadas com a composição química, sobretudo com a fração fenólica e fração volátil, e também por todos os processos que o azeite passou até chegar à prova, que vão desde a produção das azeitonas, extração, armazenamento, embalamento e conservação. No que respeita aos fenóis, estes são importantes componentes minoritários funcionais dos azeites, sendo os responsáveis pelas sensações sensoriais gustativas como o amargo e o picante (Andrewes et al., 2003; Tura et al., 2008).

Os lotes de azeite selecionados para a execução do estudo eram todos classificados na categoria de azeite virgem extra, sem nenhum defeito do ponto de vista sensorial e com a mediana do frutado superior a 1,0, o que está de acordo com o constante no Regulamento Europeu 2568/91, e nas suas sucessivas atualizações cuja mais recente foi publicada pelo Regulamento de Execução (EU) 2015/1833 da Comissão, para a categoria. Os lotes foram selecionados de acordo com o seu teor em fenóis totais (1000, 865, 600 e 400 mg/kg), e como tal com intensidades diferentes de amargo e picante (Quadro 5; Figura 8) uma vez que ambos os atributos se encontram relacionados com os teores destes compostos.

No que respeita às sensações olfativas, o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas influenciou negativamente a sensação de **frutado**, sendo de salientar que nos azeites submetidos aos maiores tempos de aquecimento, nomeadamente  $t = 5_{\text{min}}$ ,  $t = 10_{\text{min}}$ , o frutado não foi detetado na avaliação sensorial. O tempo de aquecimento afetou também a sensação a **outros frutos** e **outras sensações positivas**, uma vez que antes do aquecimento e nos tempos mais baixos de exposição a micro-ondas foram identificados aromas de tomate, **maçã**, **frutos secos**, **casca de banana**, **rama de tomate**, **erva**, **folhas de oliveira**, entre outros, sensações que desapareceram nos tempos de aquecimento mais longos. É de referir que mesmo nos azeites com maiores intensidades iniciais nestas sensações, a sua intensidade foi diminuindo com o aquecimento para desaparecer nos tempos  $t = 5_{\text{min}}$  e  $t = 10_{\text{min}}$ . Também as sensações **verde** e **outras sensações** não foram detetadas nos tempos de aquecimento superiores.

Relativamente à **harmonia** verificou-se que os diferentes teores iniciais de fenóis não afetaram este parâmetro uma vez que as amostras com maiores e menores teores iniciais de fenóis apresentaram valores semelhantes. Este resultado corresponde ao que seria de esperar em azeites de qualidade uma vez que a harmonia dá uma ideia do equilíbrio entre as diferentes sensações, sendo melhor pontuada em azeites equilibrados em que nenhuma sensação se sobrepõe às restantes.

Com relação às **sensações gustativas**, nomeadamente ao **frutado** verificou-se que as amostras com maiores teores iniciais de fenóis totais, apresentaram em  $t = 3_{\text{min}}$  uma menor nota para essa sensação, enquanto que em tempos de aquecimento superiores o frutado não foi detetado. Relativamente ao **amargo**, observou-se um decréscimo superior nos azeites com menor teor em fenóis totais, possivelmente devido a uma concentração inferior de compostos fenólicos como os derivados de hidroxitirosol e tirosol em maiores tempos de aquecimento, que de acordo com alguns autores são os principais responsáveis do amargor no azeite (Andrewes et al., 2003).

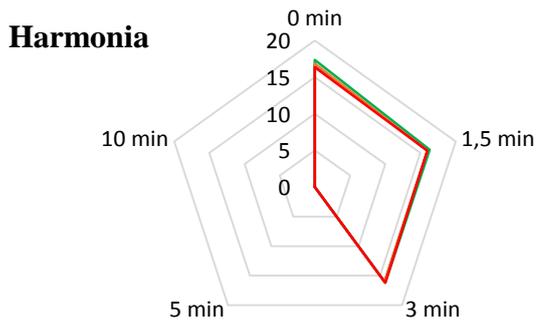
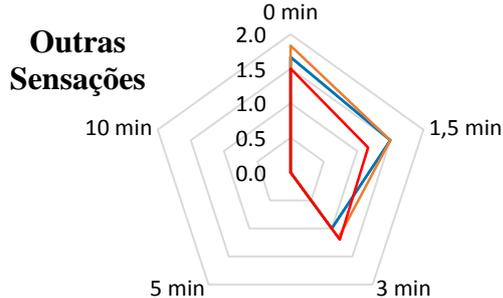
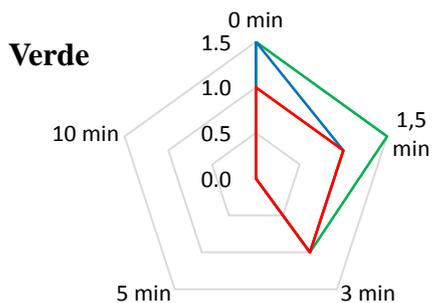
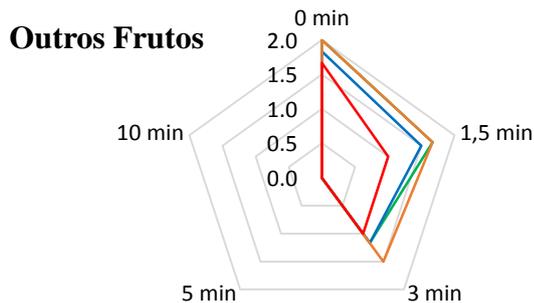
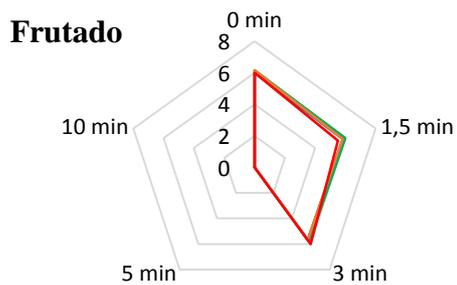
No geral, e após os três minutos iniciais de aquecimento, verificou-se que em todos os azeites se desenvolvia um odor a ranço e a cozido, que eram tão mais intensos quanto maior fosse o tempo de aquecimento. Estes atributos negativos quando presentes em azeites virgens levam a que sejam classificados como lampantes.

Relativamente à **complexidade e persistência (sensações finais)** verificou-se que ao fim de três minutos de aquecimento em micro-ondas (último tempo de aquecimento no qual foram avaliadas a complexidade e persistência) todos os azeites obtinham uma pontuação semelhante, independentemente do teor em fenóis totais inicial. Assim, observou-se um decréscimo menor nas classificações atribuídas para as essas sensações nos azeites com 600 e 400 mg/kg de teor em fenóis totais comparativamente aos que tinham um valor inicial superior (1000 e 800 mg/kg). Uma vez que a complexidade é superior quando existe um maior número de sensações, os valores mais favoráveis foram detetados inicialmente nos azeites com teores superiores de fenóis totais, sendo também nestes que se verificou uma redução mais drástica com o aquecimento, sugerindo uma degradação mais acelerada dessas amostras.

**Quadro 5.** Valores médios para o parâmetro sensorial com o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

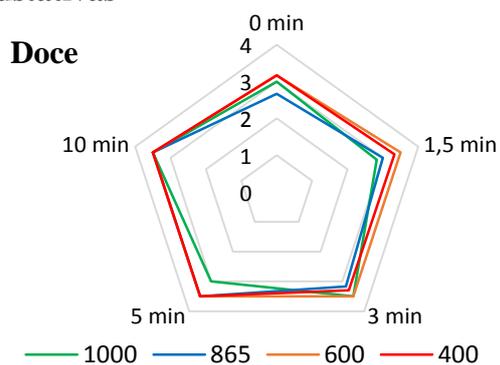
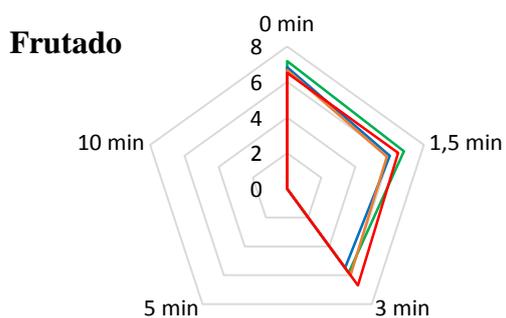
	Sensações Olfativas					Sensações Gustativas							Sensações Finais			TOTAL		
	Frutado	Outros Frutos	Verde	Outras Sensações.	Harmonia	SOMA	Frutado	Doce	Amargo	Picante	Verde	Outras Sensações	Harmonia	SOMA	Complexidade		Persistência	SOMA
<b>1000</b>																		
0	6,2±0,2	2±0,0	1,5±0,0	1,7±0,2	17,3±0,4	<b>28,7±0,4</b>	7,2±0,2	3,0±0,0	2,5±0,0	2,5±0,0	1,5±0,0	1,7±0,2	17,3±0,4	<b>35,7±0,2</b>	8,5±0,0	8,5±0,0	<b>17,0±0,0</b>	<b>81,3±0,6</b>
1,5	6,0±0,0	1,7±0,2	1,5±0,0	1,5±0,0	16,3±0,2	<b>27,0±0,0</b>	6,8±0,2	2,8±0,2	2,0±0,0	2,5±0,0	1,5±0,0	1,7±0,2	16,0±0,0	<b>33,3±0,6</b>	8,2±0,2	8,2±0,2	<b>16,3±0,4</b>	<b>76,7±0,9</b>
3	5,8±0,2	1,2±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	16,1±0,2	<b>25,2±0,2</b>	5,8±0,5	3,5±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	16,0±0,0	<b>29,3±0,6</b>	6,3±0,2	6,7±0,2	<b>13,0±0,0</b>	<b>67,5±0,3</b>
5	-	-	-	-	-	-	-	3,0±0,0	1,5±0,0	1,0±0,0	-	-	-	<b>5,5±0,0</b>	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	1,0±0,0	2,2±0,2	-	-	-	<b>6,7±0,2</b>	-	-	-	-
<b>865</b>																		
0	6,0±0,0	1,8±0,2	1,5±0,0	1,7±0,2	16,7±0,2	<b>27,7±0,6</b>	6,8±0,2	2,7±0,2	2,2±0,2	2,3±0,2	1,5±0,0	1,5±0,0	16,7±0,2	<b>33,7±0,4</b>	8,0±0,0	8,3±0,4	<b>16,3±0,4</b>	<b>77,7±0,6</b>
1,5	5,8±0,2	1,5±0,0	1,0±0,0	1,5±0,0	16,0±0,0	<b>25,8±0,2</b>	6,0±0,3	3,0±0,0	1,0±0,0	1,7±0,2	1,0±0,0	1,5±0,0	16,2±0,2	<b>30,3±0,4</b>	7,2±0,2	7,0±0,0	<b>14,2±0,2</b>	<b>70,3±0,6</b>
3	5,7±0,4	1,2±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	16,0±0,0	<b>24,8±0,6</b>	5,5±0,7	3,2±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	16,0±0,0	<b>28,7±0,6</b>	6,2±0,2	6,2±0,2	<b>12,3±0,4</b>	<b>65,8±1,1</b>
5	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	-	-	-	<b>5,5±0,0</b>	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	-	-	-	<b>5,5±0,0</b>	-	-	-	-
<b>600</b>																		
0	6,2±0,2	2,0±0,3	1,0±0,0	1,8±0,2	16,8±0,2	<b>27,8±0,9</b>	6,7±0,4	3,2±0,2	1,5±0,3	1,7±0,4	1,0±0,0	1,5±0,0	16,7±0,44	<b>32,2±1,4</b>	7,5±0,3	7,7±0,4	<b>15,2±0,8</b>	<b>75,2±3,1</b>
1,5	5,8±0,2	1,7±0,2	1,0±0,0	1,5±0,0	16,0±0,0	<b>26,0±0,3</b>	5,8±0,2	3,5±0,0	1,0±0,0	2,3±0,2	1,0±0,0	1,5±0,0	16,0±0,0	<b>31,2±0,2</b>	6,8±0,2	7,2±0,2	<b>14,0±0,0</b>	<b>71,2±0,2</b>
3	5,7±0,4	1,5±0,0	1,0±0,0	1,2±0,2	16,0±0,0	<b>25,3±0,6</b>	6,0±0,0	3,5±0,0	1,0±0,0	2,2±0,2	1,0±0,0	1,2±0,2	16,0±0,0	<b>30,8±0,2</b>	6,2±0,2	7,3±0,2	<b>13,5±0,2</b>	<b>69,7±0,2</b>
5	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	-	-	-	<b>4,5±0,0</b>	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	-	-	-	<b>5,5±0,0</b>	-	-	-	-
<b>400</b>																		
0	6,0±0,0	1,7±0,2	1,0±0,0	1,5±0,0	16,3±0,2	<b>26,5±0,3</b>	6,5±0,0	3,2±0,2	1,5±0,0	1,7±0,2	1,0±0,0	1,5±0,0	16,2±0,2	<b>31,5±0,3</b>	7,3±0,2	7,3±0,2	<b>14,7±0,4</b>	<b>72,7±0,9</b>
1,5	5,5±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0	1,7±0,2	16,0±0,0	<b>24,7±0,2</b>	6,5±0,3	3,3±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,2±0,2	16,0±0,0	<b>30,0±0,3</b>	6,0±0,0	6,0±0,0	<b>12,0±0,0</b>	<b>66,7±0,5</b>
3	6,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,2±0,2	16,2±0,2	<b>25,4±0,2</b>	6,7±0,5	3,3±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,2±0,2	16,0±0,0	<b>30,2±0,3</b>	6,8±0,2	6,7±0,2	<b>13,5±0,0</b>	<b>69,0±0,2</b>
5	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	0,7±0,2	0,5±0,0	-	-	-	<b>4,7±0,22</b>	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	3,5±0,0	0,5±0,0	0,7±0,2	-	-	-	<b>4,7±0,22</b>	-	-	-	-

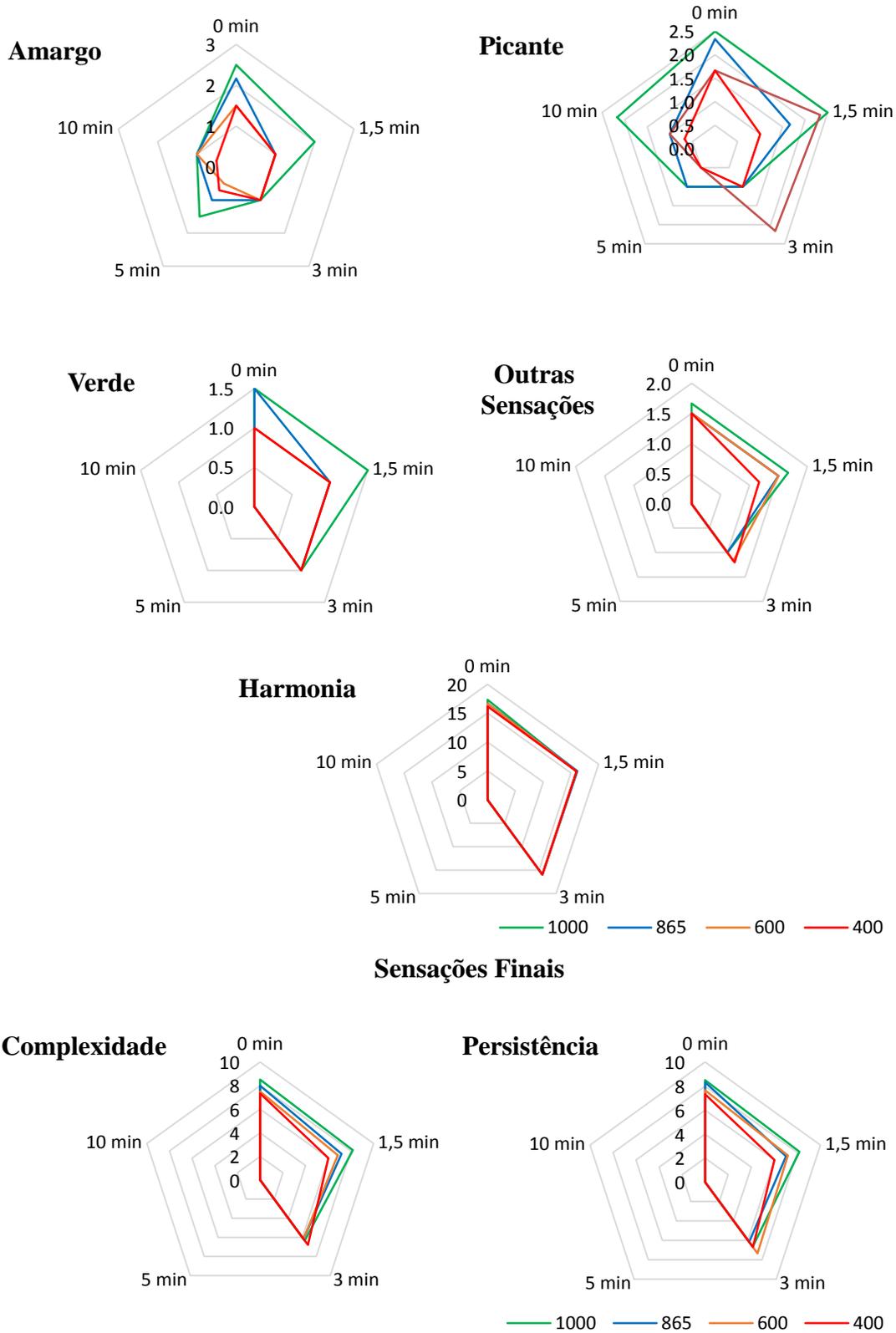
## Sensações Olfativas



— 1000 — 865 — 600 — 400

## Sensações Gustativas





**Figura 8.** Resultado da análise sensorial dos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento em micro-ondas.

Claramente, com o aquecimento em micro-ondas os atributos positivos são perdidos. Dando origem ao aparecimento de atributos negativos que afetam a componente sensorial dos azeites. No que se refere aos azeites com maiores teores em fenóis totais, houve uma “proteção” dos atributos positivos com tempos mais reduzidos de aquecimento, sendo estes atributos inexistentes em longos períodos de aquecimento.

#### **4.1.2. Acidez livre**

A avaliação da acidez é importante uma vez que permite avaliar a extensão da hidrólise. Os triglicéridos e diglicéridos são propensos a hidrólise térmica, particularmente na presença de água, liberando ácidos gordos de sua ligação éster aumentando a acidez livre. A hidrólise é influenciada pela temperatura e pelo aquecimento, pela interface entre óleo e água, e a pela quantidade existente de água e vapor (Malheiro et al., 2011).

No presente trabalho os azeites escolhidos foram todos classificados na categoria de azeite virgem extra antes do aquecimento, com valores de acidez livre de 0,3, 0,3, 0,4 e 0,4% para os azeites com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg de fenóis totais, respectivamente. Considerando que em trabalhos anteriores do mesmo grupo (Malheiro et al., 2009) em que diferentes azeites com Denominação de Origem Protegida de várias regiões de Portugal foram expostos a aquecimento em micro-ondas em tempos semelhantes, 1, 3, 5, 10 e 15 min a 1000W, a acidez não sofreu alterações significativas com o aquecimento, no presente trabalho apenas foi avaliado este parâmetro no tempo inicial e final, não existindo qualquer alteração nos valores encontrados.

Nas reações hidrolíticas que levam ao aumento da acidez no azeite estão envolvidas enzimas (lípases) que se encontram presentes no fruto (azeitona) ou são produzidas por microrganismos. Uma vez que os lotes utilizados no presente trabalho eram de azeites de qualidade, que foram extraídos de frutos sãos e em boas condições, e que posteriormente foram filtrados, a ocorrência de enzimas é pouco provável não ocorrendo variação neste parâmetro.

Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados para outros óleos edíveis por outros autores, nomeadamente Chiavaro et al. (2010) que aqueceram óleo de amendoim, girassol e canola em micro-ondas (720W) durante períodos de tempo semelhantes aos usados no presente trabalho, não observando diferenças com significados estatístico no que respeita à variação da acidez com o tempo, apesar de

terem detetado um ligeiro aumento no tempo mais elevado ( $t = 15_{\text{min}}$ ). Os resultados obtidos estão também em conformidade com os reportados por Albi et al. (1997a) em que verificaram um ligeiro incremento na acidez de azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas, sem qualquer significado.

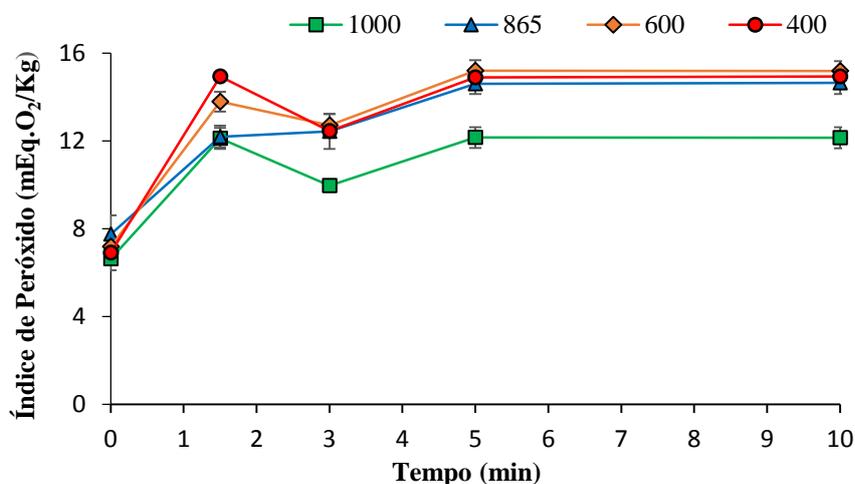
#### **4.1.3. Índice de peróxido**

A oxidação é a alteração química mais comum nos óleos vegetais e é promovida por vários fatores como sejam a presença de oxigénio/ar, luz, calor/temperatura, presença de metais, entre outros. Durante a primeira fase de oxidação, ocorre a formação de hidroperóxidos a partir de ácidos gordos insaturados, sendo o índice de peróxido (IP) um indicador muito sensível da extensão da oxidação primária de lípidos (Malheiro et al., 2011).

No início do estudo ( $t = 0_{\text{min}}$ ), todos os azeites apresentavam valores muito semelhantes de índice de peróxido variando os seus valores entre 6,6 e 6,9 meq.  $\text{O}_2/\text{kg}$  para os azeites com maiores e menores teores de fenóis totais, respetivamente. Com o aquecimento, logo no período inicial, todos os azeites viram o valor de IP aumentar para mais do dobro, para praticamente estabilizar a partir de então. O comportamento foi em todos semelhantes, com a exceção do azeite com teor superior em fenóis totais onde os valores de IP se mantiveram significativamente inferiores aos restantes (Figura 9).

O tempo máximo de aquecimento ( $t = 10_{\text{min}}$ ) não desencadeou a formação de compostos da oxidação secundária, visto não se notar uma diminuição no IP. Este índice sofre alterações ao longo do processo oxidativo alcançando um valor máximo durante a formação dos hidroperóxidos iniciais, e um decréscimo quando a taxa de conversão em compostos da oxidação secundária ultrapassam a formação dos compostos da oxidação primária (Malheiro et al., 2011). Em todos os azeites analisados foi estabelecida uma correlação positiva altamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre o tempo de aquecimento em micro-ondas e o índice de peróxido. Globalmente os resultados obtidos são semelhantes aos registados por outros autores, e inferiores aos reportados por Malheiro et al. (2009) que em azeite “Azeite de Moura” DOP após aquecimento em micro-ondas no tempo máximo de aquecimento ( $t = 15_{\text{min}}$ ), registaram um valor superior a 20 meq.  $\text{O}_2/\text{kg}$  de azeite, o que supera o limite máximo permitido pela legislação e, conseqüentemente, perda de sua classificação na categoria de azeite virgem (Regulamento Delegado (UE)

2015/1830 da Comissão), o que poderá estar associado à composição química do azeite em questão.



**Figura 9.** Mudanças ocorridas no índice de peróxido (mEq.O<sub>2</sub>/kg) em azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento por micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

O azeite virgem é mais vulnerável ao processo de oxidação do que o azeite virgem extra (Malheiro et al., 2009), o que provavelmente está relacionado com o maior teor compostos fenólicos e de tocoferóis, de uma maneira geral observados em maior abundância nos azeites virgem extra, que fornecem maior proteção contra radicais livres e vias oxidativas. No presente estudo, verificou-se também que os azeites com maiores teores iniciais de fenóis, apresentavam no fim do processamento térmico um menor valor de IP. Uma vez que estes azeites possuíam um maior teor em compostos fenólicos e que estes têm propriedades altamente antioxidantes, cumprindo a sua função, evitando a oxidação dos ácidos gordos e consequente formação dos hidroperóxidos nos azeites.

## 4.2. Efeito do aquecimento em micro-ondas na composição química de azeites

### 4.2.1. Composição em ácidos gordos

A reação do oxigênio com ácidos gordos insaturados é a principal causa de degradação dos lípidos ou alimentos que contém lípidos levando à perda de qualidade e valor nutricional, além do desenvolvimento de sabores estranhos e compostos potencialmente perigosos (Malheiro et al., 2011).

No presente trabalho foram detetados e quantificados os ácidos gordos C12:0, C12:1, C13:0, C14:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2,

C18:3, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C20:5, C21:0, C22:0, C22:1, C22:2, C23:0, C24:0, no entanto por uma facilidade de apresentação e discussão de resultados apenas serão abordados o ácido palmítico (C16:0), o esteárico (C18:0), o oleico (C18:1), o linoleico (C18:2) e o linolénico (C18:3). Apresenta-se também o somatório dos ácidos gordos saturados (AGS), dos monoinsaturados (AGM), dos polinsaturados (AGP) e os isômeros *Trans*, onde foram incluídos todos os ácidos gordos identificados nas diferentes categorias.

A composição dos azeites avaliados, no geral é muito semelhante. Assim, o ácido gordo maioritário foi o oleico, e que antes do aquecimento variou entre um mínimo de 72,44% (azeite com 1000 mg/kg de fenóis totais) e o máximo de 76,02%, no azeite com 600 mg/kg de fenóis totais. O ácido palmítico foi o segundo mais representado andando à volta dos 11% em todas as amostras, seguido do linoleico, a variar entre os 6,26% (azeite com 600 mg/kg de fenóis totais) e os 8,88% (azeite com 400 mg/kg de fenóis totais), o esteárico com valores a oscilar entre o máximo de 3,78% e o mínimo de 2,27%, e do linolénico em que todos os azeites apresentaram valores a rondar o 1% (Quadro 6).

Quando sujeito a aquecimento em micro-ondas em  $t = 10_{\min}$ , verificou-se redução nos ácidos gordos polinsaturados linolénico e linoleico (C18:3 e o C18:2 respetivamente). Esses ácidos polinsaturados representados por um ácido gordo essencial: o ácido linoleico (família ômega-6) e o ácido linolénico (família ômega-3), são de grande importância nutricional uma vez que não são sintetizados pelo organismo e precisam ser obtidos através da dieta.

Para o ácido esteárico (C18:0) verificou-se apenas um pequeno incremento em seu teor em todas as amostras ao longo do aquecimento em micro-ondas, sempre com valores inferiores para os azeites com menor teor em fenóis. O ácido palmítico (C16:0), assim como o C18:0, também apresentaram ao longo do aquecimento incremento em seu teor nas diferentes amostras.

**Quadro 6.** Efeito do aquecimento de azeites virgens extra com diferentes teores iniciais de fenóis totais na composição em ácidos gordos, expressa em percentagem (média±desvio padrão; n = 3).

Ácidos gordos	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	Fenóis totais	0	1,5	3	5		
<b>C16:0</b>							
1000	11,56±0,07 <sup>b, A</sup>	12,12±0,31 <sup>b, A-C</sup>	11,73±0,05 <sup>b, B</sup>	12,02±0,15 <sup>c, B, C</sup>	11,91±0,06 <sup>a, C</sup>	0,107	n.s.
865	11,05±0,06 <sup>a, A</sup>	11,21±0,13 <sup>a, A, B</sup>	11,26±0,19 <sup>a, A, B</sup>	11,32±0,13 <sup>a, B</sup>	11,93±1,24 <sup>a, b, A, B</sup>	0,167	*
600	11,56±0,09 <sup>b, A</sup>	11,97±0,38 <sup>b, A, B</sup>	11,78±0,34 <sup>a-c, A, B</sup>	11,61±0,04 <sup>b, A</sup>	12,01±0,18 <sup>a, b, B</sup>	0,055	n.s.
400	11,66±0,07 <sup>b, A</sup>	13,03±0,12 <sup>c, C</sup>	11,60±0,03 <sup>c, B</sup>	11,95±0,03 <sup>c, B</sup>	12,07±0,05 <sup>b, B</sup>	0,001	n.s.
<b>C18:0</b>							
1000	3,59±0,04 <sup>d, A</sup>	3,78±0,09 <sup>d, B</sup>	3,54±0,03 <sup>d, A</sup>	3,57±0,04 <sup>d, A</sup>	3,62±0,01 <sup>d, A, B</sup>	0,051	n.s.
865	3,11±0,02 <sup>c, A</sup>	3,10±0,03 <sup>c, A</sup>	3,10±0,02 <sup>c, A</sup>	3,13±0,05 <sup>c, A</sup>	3,13±0,09 <sup>c, A</sup>	0,029	n.s.
600	2,68±0,01 <sup>b, A</sup>	2,72±0,03 <sup>b, A, B</sup>	2,72±0,01 <sup>b, B</sup>	2,71±0,01 <sup>b, B</sup>	2,76±0,07 <sup>b, A, B</sup>	0,449	*
400	2,27±0,01 <sup>a, A</sup>	2,29±0,03 <sup>a, A</sup>	2,29±0,02 <sup>a, A</sup>	2,30±0,01 <sup>a, A</sup>	2,29±0,02 <sup>a, A</sup>	0,122	n.s.
<b>C18:1</b>							
1000	72,44±0,20 <sup>a, A, B</sup>	71,58±0,62 <sup>a, A, B</sup>	72,43±0,06 <sup>a, A, B</sup>	72,16±0,16 <sup>a, A</sup>	72,49±0,05 <sup>a, B</sup>	0,043	n.s.
865	75,12±0,10 <sup>c, C</sup>	74,77±0,17 <sup>b, A-C</sup>	74,94±0,12 <sup>b, A-C</sup>	74,85±0,13 <sup>c, A, B</sup>	74,09±1,38 <sup>a-c, A, C</sup>	0,152	*
600	76,02±0,05 <sup>d, B</sup>	75,43±0,29 <sup>c, A</sup>	75,58±0,23 <sup>c, A, B</sup>	75,72±0,06 <sup>d, A</sup>	75,41±0,31 <sup>c, A</sup>	0,173	*
400	73,52±0,07 <sup>b, B</sup>	72,36±0,08 <sup>a, A</sup>	73,05±0,40 <sup>a, A, B</sup>	73,36±0,11 <sup>b, B</sup>	73,19±0,13 <sup>b, B</sup>	0,000	n.s.
<b>C18:2</b>							
1000	8,39±0,07 <sup>c, B</sup>	8,28±0,10 <sup>c, B</sup>	8,35±0,02 <sup>a, B</sup>	8,30±0,12 <sup>c, B</sup>	7,88±0,05 <sup>c, A</sup>	0,505	***
865	7,10±0,06 <sup>b, A</sup>	7,16±0,06 <sup>b, A</sup>	7,06±0,07 <sup>b, A</sup>	6,97±0,13 <sup>b, A</sup>	6,84±0,20 <sup>b, A</sup>	0,375	***
600	6,26±0,03 <sup>a, A, B</sup>	6,21±0,08 <sup>a, A, B</sup>	6,26±0,05 <sup>a, A, B</sup>	6,31±0,04 <sup>a, B</sup>	6,04±0,13 <sup>a, A</sup>	0,171	*
400	8,88±0,09 <sup>d, B</sup>	8,60±0,10 <sup>d, A</sup>	8,64±0,09 <sup>d, A</sup>	8,57±0,05 <sup>d, A</sup>	8,52±0,08 <sup>d, A</sup>	0,540	***
<b>C18:3</b>							
1000	0,99±0,01 <sup>a, C</sup>	0,99±0,02 <sup>c, B, C</sup>	0,98±0,01 <sup>c, B, C</sup>	0,96±0,01 <sup>b, B</sup>	0,91±0,02 <sup>c, A</sup>	0,671	***
865	0,97±0,02 <sup>a, B</sup>	0,93±0,01 <sup>b, B</sup>	0,93±0,01 <sup>b, B</sup>	0,94±0,02 <sup>b, B</sup>	0,89±0,04 <sup>b, c, A</sup>	0,363	***
600	0,95±0,16 <sup>a, A, B</sup>	0,86±0,01 <sup>a, B</sup>	0,87±0,01 <sup>a, B</sup>	0,87±0,02 <sup>a, B</sup>	0,78±0,02 <sup>a, A</sup>	0,228	***
400	1,06±0,15 <sup>a, B</sup>	0,93±0,01 <sup>b, B</sup>	0,96±0,02 <sup>c, B</sup>	0,93±0,02 <sup>b, B</sup>	0,86±0,01 <sup>b, A</sup>	0,307	***
<b>AGS</b>							
1000	15,73±0,09 <sup>c, C</sup>	16,45±0,41 <sup>c, D</sup>	15,63±0,07 <sup>b, B, C</sup>	15,31±0,21 <sup>c, B</sup>	14,61±0,06 <sup>c, A</sup>	0,577	***
865	14,66±0,07 <sup>b, B</sup>	14,81±0,15 <sup>a, B</sup>	14,73±0,18 <sup>a, B</sup>	14,20±0,15 <sup>a, A</sup>	14,17±1,10 <sup>a-c, A, B</sup>	0,175	*
600	14,58±0,21 <sup>b, B</sup>	15,08±0,39 <sup>a, b, B</sup>	14,82±0,35 <sup>a, B</sup>	14,01±0,03 <sup>a, b, A</sup>	13,83±0,20 <sup>b, A</sup>	0,460	***
400	14,26±0,15 <sup>a, B</sup>	15,63±0,17 <sup>b, D</sup>	14,67±0,29 <sup>a, C</sup>	13,94±0,05 <sup>a, B</sup>	13,43±0,04 <sup>a, A</sup>	0,307	**
<b>AGM</b>							
1000	71,96±0,22 <sup>a, D</sup>	70,86±0,61 <sup>a, C</sup>	71,28±0,06 <sup>a, C</sup>	68,14±0,16 <sup>a, B</sup>	65,58±0,05 <sup>a, A</sup>	0,836	***
865	74,40±0,10 <sup>c, D</sup>	73,72±0,16 <sup>b, C</sup>	73,54±0,13 <sup>b, C</sup>	70,47±0,13 <sup>a, C</sup>	66,86±1,27 <sup>a-c, A</sup>	0,818	***
600	75,36±0,04 <sup>d, D</sup>	74,44±0,28 <sup>c, C</sup>	74,25±0,23 <sup>c, C</sup>	71,35±0,06 <sup>d, B</sup>	68,07±0,31 <sup>c, A</sup>	0,867	***
400	73,00±0,07 <sup>b, D</sup>	71,51±0,09 <sup>a, C</sup>	71,90±0,46 <sup>a, C</sup>	69,25±0,12 <sup>b, B</sup>	66,17±0,13 <sup>b, A</sup>	0,865	***
<b>AGP</b>							
1000	9,12±0,07 <sup>c, D</sup>	8,96±0,12 <sup>c, C</sup>	8,98±0,03 <sup>c, C, B</sup>	8,55±0,12 <sup>c, B</sup>	7,74±0,05 <sup>c, A</sup>	0,774	***
865	7,84±0,07 <sup>b, D</sup>	7,83±0,06 <sup>b, C, D</sup>	7,67±0,08 <sup>b, C</sup>	7,31±0,11 <sup>b, B</sup>	6,84±0,20 <sup>b, A</sup>	0,804	***
600	7,01±0,19 <sup>a, C</sup>	6,84±0,09 <sup>a, C</sup>	6,86±0,06 <sup>a, C</sup>	6,62±0,06 <sup>a, B</sup>	6,05±0,14 <sup>a, A</sup>	0,731	***
400	9,65±0,13 <sup>d, D</sup>	9,21±0,11 <sup>d, C</sup>	9,24±0,11 <sup>d, C</sup>	8,79±0,06 <sup>d, B</sup>	8,30±0,08 <sup>d, A</sup>	0,901	***
<b>Trans</b>							
1000	0,11±0,03 <sup>a, A, B</sup>	0,16±0,09 <sup>a, A, B</sup>	0,10±0,01 <sup>a, A</sup>	0,10±0,01 <sup>a, b, A</sup>	0,15±0,03 <sup>a, B</sup>	0,004	n.s.
865	0,08±0,01 <sup>a, A</sup>	0,10±0,04 <sup>a, A, B</sup>	0,10±0,02 <sup>a, A</sup>	0,11±0,02 <sup>b, A</sup>	0,19±0,05 <sup>a, B</sup>	0,413	***
600	0,08±0,02 <sup>a, A</sup>	0,10±0,03 <sup>a, A, B</sup>	0,10±0,02 <sup>a, A, B</sup>	0,07±0,02 <sup>a, A</sup>	0,15±0,04 <sup>a, B</sup>	0,190	*
400	0,09±0,02 <sup>a, A</sup>	0,09±0,02 <sup>a, A, B</sup>	0,12±0,01 <sup>a, B</sup>	0,09±0,02 <sup>a, b, A, B</sup>	0,19±0,04 <sup>a, C</sup>	0,515	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-E</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

No que se refere a soma dos ácidos gordos saturados, durante o aquecimento, verificou-se diferenças estatísticas ( $P < 0,001$ ) para as diferentes amostras, podendo observar um decréscimo na concentração dessa categoria de ácido gordo, com valores inferiores para as amostras com menores teores de fenóis totais em  $t = 10_{\text{min}}$ . Durante o aquecimento verificou-se uma relação negativa, altamente significativa ( $P < 0,001$ ) para todas as amostras expostas aos diferentes tempos de aquecimento, indicando assim que o aumento do tempo de aquecimento levará a maiores perdas na concentração desse tipo de ácido gordo. A soma dos ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados apresentaram globalmente para o aquecimento diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,001$ ) apresentando reduções em seu teor em  $t = 10_{\text{min}}$ . Ainda, em  $t = 10_{\text{min}}$ , os azeites com maiores teores em fenóis, apresentaram menores perdas de ácidos gordos monoinsaturados.

Com relação aos isômeros *trans* formados é possível verificar que durante o aquecimento, as amostras com 1000 mg/kg, apresentaram em  $t = 10_{\text{min}}$ , um menor incremento desses compostos. Já as amostras com 400 mg/kg, apresentaram um aumento superior, indicando assim, uma influência positiva da presença de compostos fenólicos frente ao aumento desses compostos durante o aquecimento uma vez que níveis inferiores são desejáveis.

Caponio et al. (2003) avaliaram três óleos vegetais (azeite virgem, óleo de amendoim e girassol) antes e após aquecimento em micro-ondas sob diferentes tempos. Verificaram que, a fração de ácidos gordos saturados não sofreram alterações significativas após o aquecimento nos diferentes óleos. Os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados sofreram alterações significativas ( $P < 0,001$ ), observando uma maior perda de insaturações nos óleos sujeitos a aquecimento em micro-ondas, indicando assim, uma maior degradação, comprovado por um maior índice de peróxido nas amostras sujeitas a este tipo de aquecimento. O conteúdo dos isômeros *trans* dos ácidos gordos insaturados aumentaram significativamente ( $P < 0,001$ ) em cada caso após os tratamentos térmicos. Moreno et al. (1999) durante processo intenso de fritura de óleos, entre eles azeite virgem, também verificaram uma diminuição em componentes insaturados e um aumento nos isômeros *trans*.

Este incremento no teor em isômeros *trans* (Caponio et al., 2003; Moreno et al., 1999) também foi reportado por Albi et al. (1997b). O nível encontrado dos isômeros *trans* é de grande importância nutricional, uma vez que a sua ingestão sistemática poderá ser prejudicial à saúde do consumidor.

Mahmoud et al. (2009) reportaram aumento no teor de ácidos gordos saturados durante aquecimento em micro-ondas em azeites virgens e refinados. Ainda, para o azeite virgem ocorreu um maior decréscimo no teor em ácidos gordos polinsaturados quando aquecidos em micro-ondas.

#### **4.2.2. Composição em esteróis**

Os esteróis possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante, além de protegerem o sistema cardiovascular e prevenirem o cancro (Allouche et al., 2007). O principal esterol presente no azeite é o  $\beta$ -sitosterol, constituindo até 90-95% do total de esteróis, seguido do campesterol e estigmasterol, que compõem cerca de 3% e 1%, respetivamente. O  $\Delta^5$ -avenasterol e  $\Delta^7$ -avenasterol em menores concentrações (Allouche et al., 2007).

Globalmente, no que se diz respeito aos esteróis totais, é possível observar que em todas as amostras ocorreram reduções no teor de esteróis, porém, superiores nas amostras com 400 mg/kg e inferiores nas amostras com 800 mg/kg. Uma correlação negativa, altamente significativa, entre o teor inicial de fenóis das amostras e os esteróis totais também foi reportada ( $P < 0,001$  para todas as amostras e  $R^2 = 0,78; 0,85; 0,84; e 0,85$  para as amostras de 1000, 865, 600, 400 mg/kg, respetivamente). É possível observar certa influência positiva do teor inicial de antioxidante sobre a estabilidade dos esteróis, evitando assim a formação de compostos provenientes da oxidação de esteróis que poderão ser prejudiciais a saúde humana.

Com relação ao  $\beta$ -sitosterol foi possível verificar que houve uma pequena degradação com o aumento do aquecimento. As reduções em  $t = 10_{\min}$  em sua percentagem inicial de  $\beta$ -sitosterol foi 0,12; 0,15; 0,19 e 0,13 para as amostras com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg respetivamente. Ainda, não foi verificado uma correlação significativa para as amostras com maiores e menores teores de iniciais em fenóis.

Para o campesterol, foi possível observar um incremento da sua concentração com o aumento do aquecimento. Em azeites não aquecidos observou-se uma percentagem inicial de 2,42 e 2,64% para os maiores e os menores teores iniciais de fenóis totais respetivamente. Em  $t = 10_{\min}$ , essas amostras tiveram um incremento de 0,11 e 0,05 em sua percentagem, respetivamente. Foi observado uma correlação positiva para todas as amostras indicando assim, o aumento do campesterol com o aumento da temperatura de aquecimento em micro-ondas.

Com o aumento do tempo de aquecimento, também foi possível observar o incremento do teor de estigmasterol. Independentemente do tempo de aquecimento aplicado, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ), entre as amostras sempre com valores mais elevados para os azeites com 400 mg/kg. Verificou-se também, que para os azeites com 1000, 800 e 400 mg/kg de fenóis, não ocorreram correlações significativas, indicando assim, que para estas amostras o teor em estigmasterol não foi influenciado diretamente pelos tempos de aquecimento.

Com relação ao colesterol, houve maiores reduções nos azeites com menores concentrações de fenóis totais iniciais. No azeite com 1000 mg/kg foi possível observar uma redução de apenas 0,02 em sua percentagem inicial de colesterol, diferentemente para os azeites com 865, 600 e 400 mg/kg, na qual, as reduções foram de 0,04, 0,06 e 0,05. De modo geral, os azeites em  $t = 1,5_{\text{min}}$  apresentaram um aumento da concentração em colesterol, diminuindo após o aumento do tempo de exposição em micro-ondas.

Verificou-se que todas as amostras (independentemente do teor inicial de fenóis), apresentaram diferenças estatísticas ( $P < 0,001$  para  $t = 0$ ,  $t = 1,5$ ,  $t = 3$  e  $t = 10_{\text{min}}$ , e  $P = 0,001$  para  $t = 5_{\text{min}}$ ) sempre com teores mais baixos de colesterol com o aumento do aquecimento a partir de  $t = 3_{\text{min}}$  (Quadro 7). Nos resultados obtidos verificou-se também uma correlação significativa negativa, para as amostras com 1000 mg/kg ( $P < 0,024$ ) ( $y = -0,013x + 0,327$ ) e 865 mg/kg ( $P < 0,019$ ) ( $y = -0,0114x + 0,322$ ), ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado maiores perdas no teor em colesterol.

O  $\Delta -7$  estigmastenol apresentou comportamento diferente dos outros esteróis individuais, pois, não foi verificado comportamento típico ao longo dos diferentes tempos de aquecimento. As amostras com 1000 mg/kg, apresentou em  $t = 10_{\text{min}}$ , redução deste composto, já as amostras com 865, 600 e 400 mg/kg, foi possível observar um incremento em  $\Delta -7$  estigmastenol quando aquecida a este mesmo tempo. De modo geral, foi possível verificar correlações significativas entre os diferentes tempos de aquecimento e o teor de  $\Delta -7$  estigmastenol, exceto para a amostra com menor teor inicial de fenóis, que não apresentou correlações significativas.

Albi et al. (1997b) não verificou diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) com relação aos esteróis em azeite virgem e azeite submetidos a aquecimento em micro-ondas.

Ainda, neste presente estudo, não foi verificado a presença do esterol brassicasterol nos azeites sem e com tratamento térmico.

**Quadro 7.** Efeito do aquecimento em micro-ondas no conteúdo de esteróis individuais (%) e esteróis totais (mg/kg) de azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais (média±desvio padrão; n = 3).

Esteróis Fenóis totais	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	0	1,5	3	5	10		
<b>Colesterol</b>							
1000	0,29±0,01 <sup>b, C</sup>	0,34±0,01 <sup>d, D</sup>	0,30±0,01 <sup>b, C</sup>	0,24±0,00 <sup>b, A</sup>	0,27±0,00 <sup>c, B</sup>	0,332	*
865	0,28±0,01 <sup>b, B</sup>	0,30±0,01 <sup>b, B</sup>	0,33±0,00 <sup>b, B</sup>	0,24±0,00 <sup>b, A</sup>	0,24±0,01 <sup>b, A</sup>	0,353	*
600	0,32±0,00 <sup>c, C</sup>	0,32±0,01 <sup>c, C</sup>	0,23±0,01 <sup>c, C</sup>	0,23±0,00 <sup>b, A</sup>	0,26±0,01 <sup>c, B</sup>	0,498	**
400	0,26±0,00 <sup>a, B</sup>	0,27±0,00 <sup>a, B</sup>	0,22±0,00 <sup>a, A</sup>	0,21±0,01 <sup>a, A</sup>	0,21±0,00 <sup>a, A</sup>	0,728	***
<b>Campesterol</b>							
1000	2,42±0,15 <sup>a, A</sup>	2,53±0,15 <sup>b, B</sup>	2,52±0,02 <sup>b, B</sup>	2,55±0,00 <sup>b, B</sup>	2,53±0,02 <sup>b, B</sup>	0,480	**
865	2,36±0,11 <sup>a, A</sup>	2,40±0,01 <sup>a, B</sup>	2,43±0,00 <sup>a, B, C</sup>	2,45±0,01 <sup>a, C</sup>	2,43±0,02 <sup>a, B, C</sup>	0,657	***
600	2,53±0,11 <sup>b, A</sup>	2,59±0,01 <sup>c, A, B</sup>	2,65±0,00 <sup>c, B, C</sup>	2,62±0,05 <sup>b, B, C</sup>	2,66±0,00 <sup>c, C</sup>	0,641	***
400	2,64±0,04 <sup>c, A</sup>	2,68±0,02 <sup>d, A, B</sup>	2,69±0,02 <sup>d, A, B</sup>	2,76±0,16 <sup>c, B</sup>	2,69±0,05 <sup>c, A, B</sup>	0,320	*
<b>Estigmasterol</b>							
1000	0,73±0,016 <sup>b, A</sup>	0,81±0,00 <sup>b, B</sup>	0,77±0,00 <sup>b, B</sup>	0,79±0,00 <sup>b, B</sup>	0,78±0,01 <sup>b, B</sup>	0,170	n.s.
865	0,59±0,00 <sup>a, A</sup>	0,67±0,37 <sup>a, B</sup>	0,65±0,00 <sup>a, A, B</sup>	0,65±0,00 <sup>a, A, B</sup>	0,66±0,14 <sup>a, B</sup>	0,222	n.s.
600	0,79±0,15 <sup>c, A</sup>	0,84±0,00 <sup>b, c, A, B</sup>	0,85±0,00 <sup>c, B</sup>	0,83±0,02 <sup>b, A, B</sup>	0,86±0,13 <sup>c, B</sup>	0,475	**
400	0,89±0,02 <sup>d, A, B</sup>	0,87±0,00 <sup>c, A</sup>	0,87±0,01 <sup>d, B</sup>	0,92±0,00 <sup>c, B</sup>	0,86±0,01 <sup>c, A</sup>	0,004	n.s.
<b>β-Sitosterol</b>							
1000	96,04±0,01 <sup>c, C</sup>	95,81±0,03 <sup>b, A</sup>	95,89±0,00 <sup>c, B</sup>	95,93±0,05 <sup>b, B</sup>	95,92±0,00 <sup>b, B</sup>	0,036	n.s.
865	96,29±0,01 <sup>d, B</sup>	96,24±0,06 <sup>c, B</sup>	96,19±0,00 <sup>d, A</sup>	96,21±0,04 <sup>c, A, B</sup>	96,14±0,01 <sup>c, A</sup>	0,525	**
600	95,86±0,03 <sup>b, B</sup>	95,79±0,01 <sup>b, B</sup>	95,84±0,01 <sup>b, B</sup>	95,86±0,08 <sup>b, B</sup>	95,67±0,02 <sup>a, A</sup>	0,324	*
400	95,58±0,06 <sup>a, A</sup>	95,66±0,02 <sup>a, A, B</sup>	95,69±0,03 <sup>a, B</sup>	95,56±0,01 <sup>a, A</sup>	95,71±0,05 <sup>a, B</sup>	0,102	n.s.
<b>Δ -7 estigmastenol</b>							
1000	0,22±0,00 <sup>c, C</sup>	0,19±0,01 <sup>d, B</sup>	0,16±0,01 <sup>c, A</sup>	0,15±0,01 <sup>a, A</sup>	0,19±0,01 <sup>b, B</sup>	0,299	*
865	0,15±0,00 <sup>a, b, C</sup>	0,05±0,00 <sup>a, A</sup>	0,13±0,00 <sup>a, B</sup>	0,15±0,00 <sup>a, C</sup>	0,21±0,00 <sup>c, D</sup>	0,341	*
600	0,16±0,01 <sup>b, C</sup>	0,14±0,00 <sup>c, A</sup>	0,15±0,00 <sup>b, B</sup>	0,14±0,004 <sup>a, A, B</sup>	0,21±0,001 <sup>c, D</sup>	0,321	*
400	0,15±0,00 <sup>a, C</sup>	0,08±0,00 <sup>b, A</sup>	0,14±0,00 <sup>a, B</sup>	0,15±0,00 <sup>a, C</sup>	0,15±0,00 <sup>a, C</sup>	0,118	n.s.
<b>Esteróis totais</b>							
1000	1359,09±10,66 <sup>a, D</sup>	1265,14±1,65 <sup>a, C</sup>	1278,04±9,86 <sup>b, C</sup>	1238,92±2,11 <sup>a, B</sup>	1038,31±5,14 <sup>a, A</sup>	0,782	***
865	1430,06±4,70 <sup>c, E</sup>	1307,51±6,98 <sup>b, C</sup>	1345,45±9,04 <sup>c, D</sup>	1258,62±9,24 <sup>a, B</sup>	1171,48±12,68 <sup>b, A</sup>	0,854	***
600	1398,66±5,13 <sup>b, D</sup>	1328,02±4,78 <sup>c, C</sup>	1236,14±7,90 <sup>a, B</sup>	1264,96±5,00 <sup>a, B</sup>	1048,64±23,26 <sup>a, A</sup>	0,838	***
400	1629,14±13,29 <sup>d, E</sup>	1398,15±12,27 <sup>d, C</sup>	1453,75±0,11 <sup>d, D</sup>	1325,74±21,86 <sup>b, B</sup>	1200,33±0,56 <sup>b, A</sup>	0,853	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-E</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

Os teores de esteróis se encontraram dentro dos respectivos limites de variabilidade imposta pela Legislação vigente da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015). Através da análise realizada para quantificar esteróis foi possível obter resultados também para os diálcoois triterpénicos. Os teores de uvaol e eritrodíol também se encontraram dentro dos limites legais estabelecidos nos azeites sem aquecimento e após os diferentes tempos de aquecimento ( $\leq 4,5\%$ ). Este teor é usado como parâmetro de qualidade, uma vez que um teor muito elevado destes diálcoois triterpénicos é um indicativo de azeites obtidos através de solventes.

#### **4.2.3. Tocoferóis**

Os tocoferóis mais comumente descritos em azeites foram detetados e quantificados neste trabalho, nomeadamente  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol. Juntamente com os compostos fenólicos, são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante do azeite, especialmente o  $\alpha$ -tocoferol. Estudos têm demonstrado que os tocoferóis não só inibem a formação de hidroperóxidos em diversos substratos, como também reduzem o valor total dos produtos da decomposição de hidroperóxidos. Ainda, apresentam uma importante ação vitamínica (vitamina E), sendo essenciais à partir do ponto de vista nutricional (Kamal-Eldin & Budilarto et al., 2015; Farhoosh et al., 2012). O efeito dos diferentes tempos de aquecimento em forno micro-ondas, no teor de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol e no teor de vitamina E total, pode ser observado no Quadro 8.

Para os diferentes tempos de aquecimento observou-se uma influência direta entre o teor inicial de fenóis das amostras e o teor de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol e vitamina E total, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ).

Com relação ao teor de  $\alpha$ -tocoferol, é possível observar que houve maiores reduções nos azeites com menores concentrações de fenóis totais iniciais. As reduções foram de 65, 71, 83 e 80% para os azeites com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg, respetivamente, indicando assim uma maior proteção do  $\alpha$ -tocoferol nos azeites com maiores teores de fenóis, uma vez que, em  $t = 0_{\min}$ , para o azeite com 865, 600 e 400 mg/kg, não se verificou diferenças significativas entre o teor inicial de  $\alpha$ -tocoferol.

**Quadro 8.** Efeito do aquecimento em micro-ondas no conteúdo em tocoferóis e de vitamina E total (mg/kg) de azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais (1000, 865, 600, 400 mg/kg) (média±desvio padrão; n = 3).

Tocoferóis Fenóis totais	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	0	1,5	3	5	10		
<b><math>\alpha</math>-T</b>							
1000	259,72±24,21 <sup>b,C</sup>	221,30±24,43 <sup>b,C</sup>	228,83±3,56 <sup>c,C</sup>	172,04±12,34 <sup>c,B</sup>	90,13±15,83 <sup>c,A</sup>	0,799	***
865	211,32±7,88 <sup>a,D</sup>	207,17±13,81 <sup>b,D</sup>	175,16±4,55 <sup>b,C</sup>	111,06±5,33 <sup>b,B</sup>	60,49±6,37 <sup>b,A</sup>	0,907	***
600	207,19±13,60 <sup>a,D</sup>	186,83±4,99 <sup>b,D</sup>	188,83±13,49 <sup>b,C</sup>	97,88±8,30 <sup>a,b,B</sup>	34,89±7,89 <sup>a,A</sup>	0,842	***
400	218,69±18,08 <sup>a,C</sup>	87,92±0,90 <sup>a,B</sup>	91,18±0,027 <sup>a,B</sup>	84,89±0,57 <sup>a,B</sup>	43,88±3,13 <sup>a,A</sup>	0,765	***
<b><math>\beta</math>-T</b>							
1000	2,20±0,24 <sup>b,D</sup>	1,69±0,14 <sup>a,b,B,C</sup>	1,80±0,06 <sup>c,C,D</sup>	1,68±0,06 <sup>c,B</sup>	1,30±0,05 <sup>c,A</sup>	0,677	***
865	1,85±0,08 <sup>b,c,E</sup>	1,74±0,06 <sup>a,D</sup>	1,64±0,06 <sup>b,C</sup>	1,42±0,03 <sup>b,B</sup>	1,19±0,04 <sup>b,A</sup>	0,914	***
600	1,68±0,62 <sup>a,C</sup>	1,58±0,04 <sup>a,B,C</sup>	1,73±0,20 <sup>b,c,C</sup>	1,37±0,05 <sup>b,B</sup>	1,05±0,16 <sup>a-c,A</sup>	0,580	***
400	1,76±0,08 <sup>a,b,C</sup>	1,87±0,41 <sup>a,b,C</sup>	0,76±0,005 <sup>a,A</sup>	1,24±0,05 <sup>a,B</sup>	0,95±0,09 <sup>a-c,A, B</sup>	0,512	***
<b><math>\gamma</math>-T</b>							
1000	4,93±0,19 <sup>b,C</sup>	4,37±0,31 <sup>a,B</sup>	4,53±0,02 <sup>c,B</sup>	4,29±0,13 <sup>b,B</sup>	2,75±0,18 <sup>b,A</sup>	0,646	***
865	4,51±0,13 <sup>a,D</sup>	4,36±0,006 <sup>b,D</sup>	4,00±0,07 <sup>b,C</sup>	3,52±0,07 <sup>a,B</sup>	2,38±0,09 <sup>a,A</sup>	0,868	***
600	7,02±0,44 <sup>c,C</sup>	7,07±0,11 <sup>c,C</sup>	7,39±0,77 <sup>d,C</sup>	5,76±0,17 <sup>c,B</sup>	2,78±0,11 <sup>b,A</sup>	0,589	***
400	7,05±0,35 <sup>c,D</sup>	6,32±0,07 <sup>b,C</sup>	2,93±0,03 <sup>a,A</sup>	4,24±0,15 <sup>b,B</sup>	2,56±0,12 <sup>a,b,A</sup>	0,803	***
<b>Total</b>							
1000	266,85±24,08 <sup>b,C</sup>	227,37±24,72 <sup>c,C</sup>	235,17±3,58 <sup>d,C</sup>	178,02±12,47 <sup>c,B</sup>	93,73±16,54 <sup>c,A</sup>	0,798	***
865	217,67±8,08 <sup>a,D</sup>	213,31±14,03 <sup>b,c,D</sup>	180,81±4,51 <sup>b,C</sup>	115,99±5,38 <sup>b,B</sup>	64,06±6,47 <sup>b,A</sup>	0,908	***
600	215,89±13,34 <sup>a,C</sup>	195,43±5,12 <sup>b,c,B</sup>	198,14±14,45 <sup>b,B</sup>	105,02±8,51 <sup>b,B</sup>	38,72±7,84 <sup>a,A</sup>	0,838	***
400	227,50±18,02 <sup>a,C</sup>	95,83±0,98 <sup>a,B</sup>	94,87±0,002 <sup>a,B</sup>	90,37±0,47 <sup>a,B</sup>	47,39±3,33 <sup>a,b,A</sup>	0,774	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-D</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

Segundo Pellegrini et al. (2001), os polifenóis são estabilizadores eficazes de  $\alpha$ -tocoferol durante o aquecimento do azeite, contribuindo assim, para o valor nutricional dos alimentos cozidos. Isso explica, a maior estabilidade do  $\alpha$ -tocoferol em azeites com 1000 mg/kg de fenóis.

Verificou-se também que todas as amostras (independentemente do teor inicial de fenóis), apresentaram diferenças estatísticas ( $P<0,001$ ) entre  $t = 5$  e  $t = 10_{\text{min}}$ , sempre com teores mais baixos de  $\alpha$ -tocoferol com o aumento do aquecimento (Quadro 5).

É interessante observar que nos azeites com 1000, 600 e 400 mg/kg de fenóis totais, houve um pequeno incremento no teor em  $\alpha$ -tocoferol entre o aquecimento de 1,5 e 3 minutos. Malheiro et al. (2009) verificaram as mudanças ocorridas no  $\alpha$ -tocoferol de

azeites com DOP, aquecidos em micro-ondas durante 1, 3, 5, 10 e 15 min a 1000W, e também constataram um incremento no teor de  $\alpha$ -tocoferol desses azeites até 5 min de aquecimento. O aumento do teor de  $\alpha$ -tocoferol durante os primeiros minutos de aquecimento poderia ser explicado devido à destruição de outros compostos do azeite que estão ligados a um tocoferol. Brenes et al. (2002) que reportaram perdas de 62 e 80% no teor de  $\alpha$ -tocoferol nas cultivares Picual e Arbequina, respectivamente ao serem aquecidas em micro-ondas durante 10 min (500W).

Durante o aquecimento também foi observado uma correlação negativa, altamente significativa, ( $P < 0,001$ ) para todas as amostras, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificada uma diminuição na concentração em  $\alpha$ -tocoferol: 1000 mg/kg ( $y = -38,845x + 310,940$ ); 865 mg/kg ( $y = -39,781x + 272,388$ ); 600 mg/kg ( $y = -43,348x + 273,178$ ); 400 mg/kg ( $y = -40,169x + 232,079$ ).

O teor de  $\beta$ -tocoferol diminuiu drasticamente com o aumento do aquecimento. Em  $t = 10_{\text{min}}$ , é possível verificar que nas amostras com 1000, 865, 600 mg/kg em fenóis, o teor final de  $\beta$ -tocoferol foi de apenas 60% do inicial. Na amostra com 400 mg/kg, verificou-se a existência de apenas 50% do teor inicial de  $\beta$ -tocoferol, após o aquecimento em  $t = 10_{\text{min}}$ . De modo geral, verificou-se uma maior concentração de  $\beta$ -tocoferol em azeites com maiores teores de fenóis.

O teor em  $\gamma$ -tocoferol em  $t = 0_{\text{min}}$  foi superior nas amostras com menores teores iniciais de fenóis totais (para  $\alpha$ - e  $\beta$ -tocoferol foi observado o oposto). As concentrações de 7,02 e 7,05 mg/kg foram observadas nas amostras com 600 e 400 mg/kg, respectivamente, apesar disto, estas amostras apresentaram maiores reduções em  $t = 10_{\text{min}}$ , no teor em  $\gamma$ -tocoferol. Estas reduções foram de 60 e 63%. É possível ainda concluir, que o  $\gamma$ -tocoferol diminuiu consideravelmente em tempos maiores de aquecimento, semelhante ao ocorrido para o  $\alpha$ - e  $\beta$ -tocoferol.

Globalmente, se analisarmos o teor de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol, verifica-se que o  $\alpha$ -tocoferol, foi o tocoferol com as maiores reduções, seguido pelo  $\beta$ - e pelo  $\gamma$ -tocoferol, indicando assim, uma maior atividade antioxidante deste tocoferol.

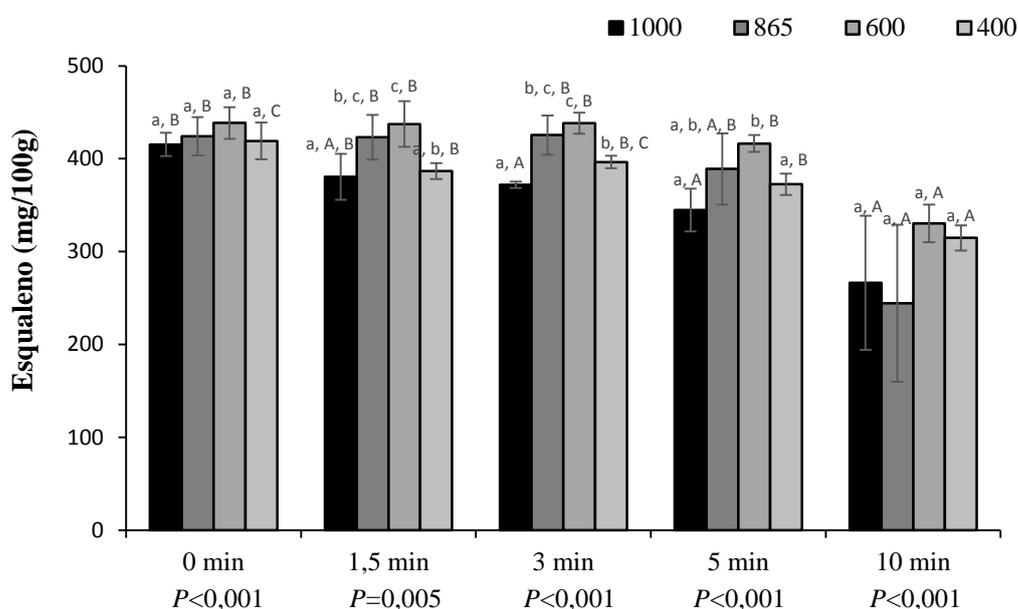
Na amostra com maior e menor teor de antioxidante, observou-se reduções em seu teor de vitamina E em 65 e 80%, respectivamente, passando de 266,8 para 93,7 mg/kg e de 227,5 para 47,4 mg/kg, obtendo uma correlação negativa, altamente significativa para todas as amostras.

Ao aquecer outros tipos de óleos como o de girassol, soja, amendoim, e uma mistura contendo óleo de soja e amendoim, Hassanein et al. (2003) observaram que o

conteúdo de tocoferol decresce com o aumento do tempo e exposição ao aquecimento e que ocorreram maiores perdas quando foram submetidos a 18 min de aquecimento em micro-ondas (227 °C). Ainda, ocorreu maiores perdas no conteúdo de tocoferóis em todos os tempos de aquecimento para o óleo de amendoim.

#### 4.2.4. Teor em esqualeno

O esqualeno desempenha um papel importante na estabilidade do azeite relativamente a auto oxidação, apresenta uma ligeira atividade antioxidante e a sua ação depende da concentração que existe no azeite (Psomiadou & Tsimidou, 2002). Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos para os teores de esqualeno nos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento em micro-ondas.



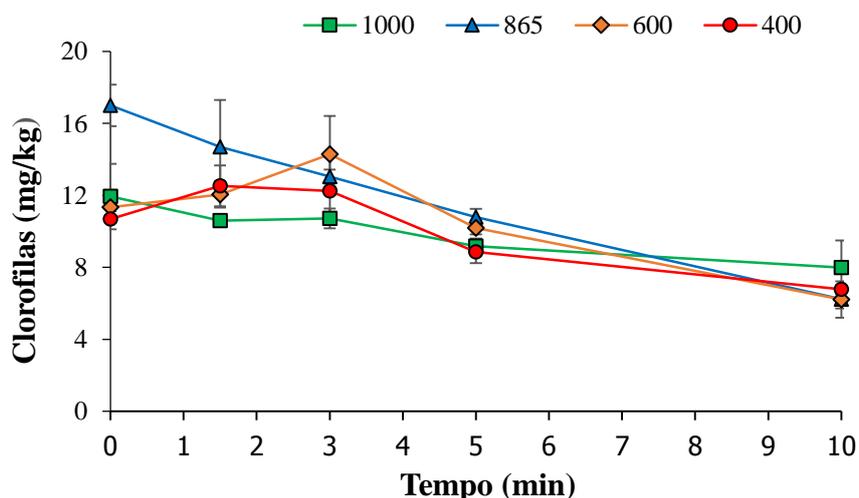
**Figura 10.** Mudanças ocorridas na concentração de esqualeno (mg/100g) em azeites com diferentes teores iniciais de fenóis totais submetidos a aquecimento por micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

No presente trabalho os azeites apresentaram-se inicialmente com com uma concentração em esqualeno de 415,4, 424,2, 438,5 e 419,2 mg/100g de azeite para os azeites com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg em fenóis totais, respectivamente. Os resultados demonstraram que durante o aquecimento em micro-ondas, em  $t = 10_{\text{min}}$ , os azeites com menores teores de fenóis, apresentaram-se com menores reduções neste teor, nomeadamente, 36 e 25% para os azeites com 1000 e 400 mg/kg, respetivamente (Figura 1). Ainda foi possível observar uma correlação negativa, altamente significativa

( $P < 0,001$ ) para as amostras com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg de fenóis totais, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma diminuição da concentração total em esqualeno. Albi et al. (1997b), ao aquecer diferentes tipos de óleos, entre eles azeite e azeite virgem, verificaram perdas de esqualeno nos azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas de 27 mg/100g.

#### 4.2.5. Clorofilas e carotenoides

As clorofilas e carotenoides desempenham um importante papel na estabilidade oxidativa do azeite virgem devido ao seu poder antioxidante natural na ausência de luz, e atividade pró-oxidante na presença de luz (Criado et al., 2008). A avaliação da extensão da degradação das clorofilas dos azeites quando submetidos a aquecimento em micro-ondas pode ser observado na Figura 11.



**Figura 11.** Mudanças ocorridas no teor de clorofilas (mg/kg) em azeites com diferentes concentrações de fenóis totais submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

No presente trabalho, em  $t = 0_{\text{min}}$ , o teor em clorofila variou de 11,9 mg/kg nos azeites com maiores teores em fenóis, nomeadamente 1000 mg/kg e 10,7 mg/kg, nos azeites com menores concentrações de fenóis (400 mg/kg). O azeite com 865 mg/kg, apresentou a maior concentração de clorofila antes do tratamento térmico (17,0 mg/kg).

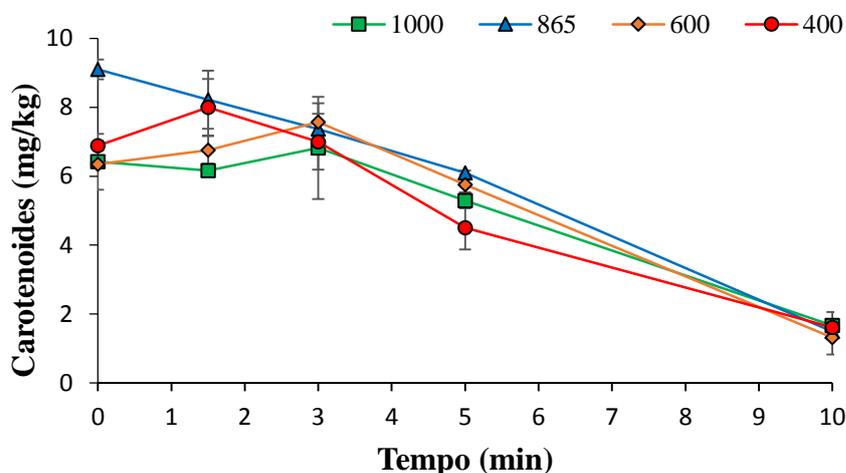
Globalmente, para azeites aquecidos em micro-ondas, obteve-se ao longo dos diferentes tempos de aquecimento menores concentrações de clorofila. Para as amostras com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg de fenóis totais, em  $t = 10_{\text{min}}$ , o teor final de clorofila obtido foi de 8,0; 6,2; 6,2 e 6,8 mg/kg, respetivamente. Observou-se uma maior redução

nos níveis de clorofilas para o azeite com 800 mg/kg de fenóis, nomeadamente 64% e uma menor redução para os azeites com maior teor iniciais de fenóis (33%).

Para os diferentes tempos de aquecimento observou-se uma influência direta entre o teor inicial de fenóis das amostras e o teor em clorofilas, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ), com valores mais elevados para os azeites com 1000 mg/kg e menores para azeites com 400 mg/kg no fim do aquecimento. Em  $t = 5_{\text{min}}$  e  $t = 10_{\text{min}}$ , observou-se maiores reduções no teor de clorofila (comparado ao controle) indicando assim, que independentemente da amostra e de seu teor inicial em fenóis totais, em tempos elevados de aquecimento em micro-ondas, o teor em clorofilas diminui consideravelmente.

Ainda, para o aquecimento em micro-ondas observou-se uma correlação negativa, altamente significativa, ( $P < 0,001$ ) para todas as amostras, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma diminuição na concentração em clorofilas: 1000 mg/kg ( $y = -0,360x + 11,490$ ); 865 mg/kg ( $y = -1,038x + 16,360$ ); 600 mg/kg ( $y = -0,661x + 13,540$ ); 400 mg/kg ( $y = -0,496x + 12,060$ ).

A avaliação da extensão da degradação dos carotenoides dos azeites quando submetidos a aquecimento em micro-ondas pode ser observado na Figura 12.



**Figura 12.** Mudanças ocorridas no teor de carotenoides (mg/kg) em azeites com diferentes concentrações de fenóis totais submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas.

Em azeites não aquecidos (controle) obteve-se 6,4 e 6,9 mg/kg de carotenoides, para os maiores e os menores teores iniciais de fenóis totais respetivamente, com diferenças significativas entre as amostras ( $P < 0,001$ ). A amostra com 865 mg/kg, também apresentou para carotenoides maiores teores iniciais. De modo geral, para o aquecimento em micro-ondas, nos diferentes tempos de aquecimento, observou-se uma

influência direta entre o teor inicial de fenóis totais e o teor em carotenoides, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) entre as amostras, sempre com valores mais elevados para os azeites com 865 mg/kg ( $9,1 \pm 0,8$  mg/kg), exceto em  $t = 10_{\text{min}}$ , onde apresenta um teor mais baixo quando comparado ao azeite com 1000 mg/kg de fenóis.

Observa-se que independentemente da amostra e de seu teor inicial em fenóis (865, 600 e 400 mg/kg), o aquecimento em micro-ondas induz a alterações significativas ( $P < 0,001$ ) em  $t = 5_{\text{min}}$  e  $t = 10_{\text{min}}$ , exceto para as amostras com 1000 mg/kg, indicando assim, uma maior proteção devido à sua maior atividade antioxidante.

Os dados obtidos ainda nos mostram que há uma correlação negativa, altamente significativa ( $P < 0,001$ ) para todas as amostras, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas, foi verificado uma diminuição na concentração em carotenoides: 1000 mg/kg ( $y = -0,516x + 7,348$ ;  $R^2 = 0,76$ ), 800 mg/kg ( $y = -0,773x + 9,499$ ;  $R^2 = 0,96$ ), 600 mg/kg ( $y = -0,596x + 7,987$ ;  $R^2 = 0,79$ ) e 400 mg/kg ( $y = -0,616x + 7,962$ ;  $R^2 = 0,82$ ).

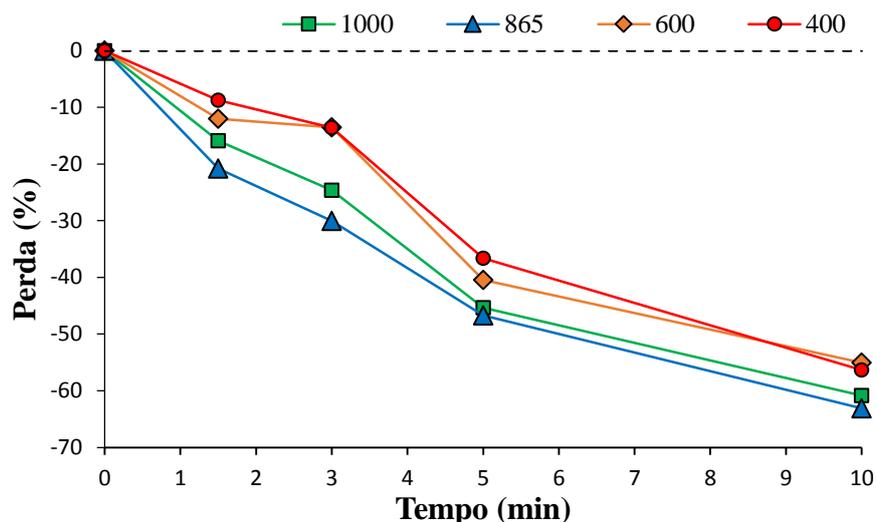
Globalmente, é possível observar que ocorreram maiores alterações no teor de carotenoides, comparativamente às clorofilas.

Malheiro et al., 2009 também constataram que os pigmentos tais como clorofilas e os carotenoides são termolábeis, uma vez que a sua quantidade diminui com o aumento do tempo de exposição ao aquecimento. Além da temperatura, a presença de oxigênio e radicais livres podem acelerar a taxa de degradação de carotenoides (Criado et al., 2008).

#### **4.2.6. Compostos fenólicos**

##### **4.2.6.1. Teor em fenóis totais**

Os componentes minoritários de maior importância do azeite são os compostos fenólicos, juntamente com os tocoferóis, devido às suas propriedades antioxidantes e nutracêuticas (Inarejos-García et al., 2010). Segundo Laguerre et al. (2007) os antioxidantes neutralizam a oxidação através de duas maneiras diferentes, ou seja, mediante a proteção dos lípidos, alvos de iniciadores ou retardando a fase de oxidação. As perdas dos fenóis totais com o aquecimento por micro-ondas encontram-se na Figura 13.



**Figura 13.** Efeito dos diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas na composição fenólica de azeites.

De uma forma geral, o aquecimento induziu a alterações significativas ( $P < 0,001$ ) no teor em fenóis totais. Neste parâmetro, a redução mais drástica ocorreu no azeite cujos teores de fenóis totais eram mais elevados (azeite com 865 mg/kg), registando-se uma redução de 63% no teor destes compostos ao fim de 10 minutos de aquecimento no micro-ondas. Para o caso do azeite com menor teor inicial destes compostos (400 mg/kg) a redução foi de 56%, para as 178 mg/kg de azeite de fenóis totais. Ainda, para o aquecimento em micro-ondas observou-se uma correlação negativa, altamente significativa, ( $P < 0,001$ ) para todos os lotes avaliados, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificada uma diminuição na concentração de fenóis totais: 1000 mg/kg ( $y = -156,758x + 1201,359$ ;  $R^2 = 0,95$ ), 800 mg/kg ( $y = -131,677x + 982,587$ ;  $R^2 = 0,95$ ), 600 mg/kg ( $y = -83,402x + 706,499$ ;  $R^2 = 0,90$ ) e 400 mg/kg ( $y = -55,8153x + 480,118$ ;  $R^2 = 0,90$ ).

De modo geral, a redução desses compostos durante o aquecimento pode ser atribuído a destruição térmica ou pela degradação oxidativa devido à sua contribuição para a estabilidade do azeite.

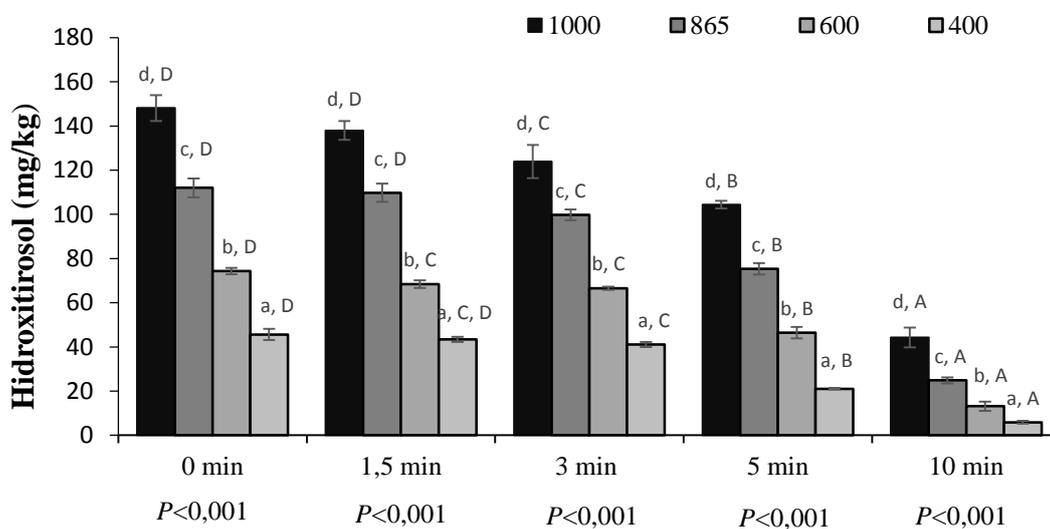
Em concordância com os resultados observados no presente estudo, Albi et al. (1997a) também verificaram perdas no conteúdo fenólico dos azeites durante o aquecimento em micro-ondas. Azeite virgem e azeite foram expostos a aquecimento em micro-ondas durante 120 min, e reportaram reduções de 95 e 85%, respetivamente. Em estudo realizado por Carretani et al. (2009), azeite virgem, azeite e óleo de bagaço foram aquecidos em micro-ondas durante 1,5, 3, 6, 9, 12, e 15 min a 720W. O conteúdo

fenólico em azeite virgem apresentou uma redução até atingir 67 mg/kg de azeite em  $t = 6_{\text{min}}$ , decréscimo de -28%. Em  $t = 15_{\text{min}}$ , atingiu-se redução de 83%. Para o azeite, tempos mais baixos de aquecimento praticamente não alterou o seu conteúdo em fenóis, chegando a níveis indetetáveis em  $t = 15_{\text{min}}$ . O mesmo foi observado por Brenes et al. (2002), ao verificarem que os azeites aquecidos simulando um processo de fritura apresentou reduções drásticas em seu conteúdo fenólico.

#### 4.2.6.2. Teor em álcoois fenólicos

Os compostos hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) e o tirosol (p-hidroxifenil álcool) pertencem à classe dos álcoois fenólicos sendo os compostos mais abundantes presentes em azeitonas de mesa e azeite (Malheiro et al., 2015). O hidroxitirosol é produzido a partir da hidrólise da oleuropeína, enquanto que o tirosol é um produto formado por hidrólise do ligstrosídeo (Charoenprasert & Mitchell, 2012). Um grande número de propriedades benéficas à saúde são previamente demonstrada para ambos.

A avaliação da extensão da degradação dos polifenóis dos azeites quando submetidos a aquecimento em micro-ondas nomeadamente o hidroxitirosol, pode ser observado na Figura 14.



**Figura 14.** Concentração de hidroxitirosol (mg/kg) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão;  $n = 3$ ). <sup>a-d</sup> Nas colunas, diferentes letras minúsculas indicam que as amostras com diferentes teores de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação um tempo de aquecimento ( $P < 0,05$ ). <sup>A-D</sup> Diferentes letras maiúsculas indicam que as amostras com mesmo teor inicial de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação aos diferentes tempos de aquecimento ( $P < 0,05$ ).

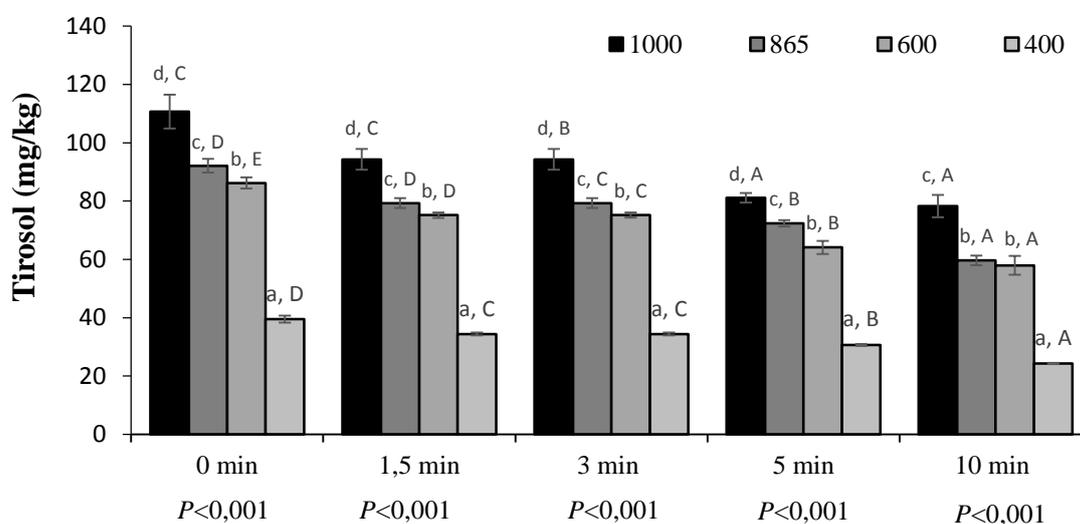
Em azeites não aquecidos (controle) verificou-se a presença de 148 mg de hidroxitirosol /kg de azeite para amostras com maiores teores iniciais de fenóis totais e 45,6 mg/kg para menores.

Globalmente, para azeites aquecidos em micro-ondas, obteve-se ao longo dos diferentes tempos de aquecimento menores concentrações de hidroxitirosol. Para a amostra com 1000 mg/kg de fenóis totais, em  $t = 10_{\text{min}}$ , o teor final de hidroxitirosol obtido foi de 44,3 mg/kg, ou seja, uma redução de 70%.

Verificou-se também uma influência direta entre o teor de fenóis totais iniciais e o teor de hidroxitirosol, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) entre as amostras.

Nos resultados obtidos observou-se uma correlação negativa, altamente significativa ( $P < 0,001$ ) para as amostras com 1000, 865, 600 e 400 mg/kg de fenóis totais, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma diminuição da concentração total de hidroxitirosol.

No que diz respeito a concentração de tirosol, avaliação da extensão da sua degradação, pode ser observado através da Figura 15.



**Figura 15.** Concentração de tirosol (mg/kg) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão;  $n = 3$ ). <sup>a-d</sup> Nas colunas, diferentes letras minúsculas indicam que as amostras com diferentes teores de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação um tempo de aquecimento ( $P < 0,05$ ). <sup>A-C</sup> Diferentes letras maiúsculas indicam que as amostras com mesmo teor inicial de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação aos diferentes tempos de aquecimento ( $P < 0,05$ ).

De uma forma geral, os diferentes tempos de aquecimento induziu a alterações significativas ( $P < 0,001$ ) no teor em tirosol, verificando-se uma influência direta entre o teor de fenóis totais iniciais e este teor.

O azeite com 1000 mg/kg apresentou em  $t = 0_{\text{min}}$ , um teor inicial de 111 mg de tirosol/kg de azeite e em  $t = 10_{\text{min}}$  reduções de 29%. A amostra com 1000 mg/kg, quando sujeita a aquecimento, não apresentou diferenças significativas a partir de 5 min de aquecimento ( $P > 0,05$ ). Os azeites com 865, 600 e 400 mg/kg apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) em maiores tempos de aquecimento.

Globalmente, ocorreu reduções mais elevadas na concentração de hidroxitirosol. Brenes et al., (2002) também verificou que ocorreu em decréscimo maior no teor de hidroxitirosol e seus derivados durante aquecimento de azeites a  $180 \pm 1^\circ\text{C}$ , uma vez que o tirosol e seus derivados não participam diretamente na estabilidade oxidativa dos azeites, porém, também diminuem sua concentração com o aquecimento.

A literatura atribui vários efeitos benéficos à saúde pelo consumo de azeite, destacando-se o papel biológico dos álcoois fenólicos tirosol e hidroxitirosol, agindo o hidroxitirosol de forma mais eficiente que o tirosol na eliminação de radicais livres.

Segundo Nissiotis & Tasioula-Margari (2002) os compostos fenólicos predominantes em azeite virgem têm um efeito antioxidante que diminui na seguinte ordem: hidroxitirosol > oleuropeína > tirosol. Um efeito sinérgico entre a oleuropeína e  $\alpha$ -tocoferol foram relatados. Gordon et al. (2001), à partir de comparações com um número limitado de outros compostos fenólicos presente em azeites, também verificou que o hidroxitirosol é o composto antioxidante mais ativo, mesmo em concentração inferior ao de outros fenóis.

Attya et al. (2010) também verificaram maiores reduções nos teores de hidroxitirosol quando comparado o tirosol. Carretani et al. (2009) observou que o hidroxitirosol reduziu 32% a mais do que o tirosol em azeite virgem aquecido em micro-ondas durante 1.,5, 3, 6, 9, 12 e 15 min a 720W.

### **4.3. Efeito do aquecimento em micro-ondas sobre as propriedades físicas dos azeites**

#### **4.3.1. Cor**

A cor é um atributo sensorial que não faz parte dos parâmetros de qualidade do azeite, contudo, os consumidores tendem a avaliar este parâmetro, ainda que com a generalização das embalagens escuras tal avaliação não seja possível na hora de

comprar. Contudo, este parâmetro permite a avaliação de alterações ocorridas no azeite, como por exemplo as alterações ocorridas ao longo do armazenamento do azeite ou resultantes de processos de processamento. A medição da cor, pelo método CIELAB, decorre sob a leitura dos parâmetros L\*, a\* e b\*, onde cada um distingue intervalos de cores primárias.

Para a avaliação do azeite sujeito a aquecimento em micro-ondas, bem como para o controlo (azeite não sujeito a tratamento térmico) no Quadro 9 estão apresentados os valores obtidos de a\*, b\* e L\*.

**Quadro 9.** Valores médios para a determinação da cor pelo modo CIELAB (L\*, a\* e b\*) em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

Parâmetro	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	0	1,5	3	5	10		
<b>Fenóis totais</b>							
<b>a*</b>							
1000	-10,89±1,26 <sup>a, B</sup>	-11,46±0,49 <sup>b, B</sup>	-12,50±0,69 <sup>a, A</sup>	-11,68±0,18 <sup>a, A, B</sup>	-5,73±0,08 <sup>b, C</sup>	0,326	***
865	-10,52±0,80 <sup>a, A</sup>	-10,68±0,68 <sup>b, A</sup>	-11,16±0,74 <sup>b, A</sup>	-10,44±0,07 <sup>c, A</sup>	-5,38±0,24 <sup>c, B</sup>	0,452	***
600	-11,21±1,25 <sup>a, B, A</sup>	-12,61±0,6 <sup>a, A</sup>	-11,16±0,63 <sup>b, B</sup>	-11,17±0,17 <sup>b, B</sup>	-6,44±0,49 <sup>a, C</sup>	0,489	***
400	-11,55±1,27 <sup>a, A</sup>	-12,09±0,10 <sup>a, A</sup>	-12,14±0,05 <sup>a, A</sup>	-12,10±0,42 <sup>a, A</sup>	-5,89±0,16 <sup>a, b, B</sup>	0,378	***
<b>b*</b>							
1000	70,42±1,31 <sup>a, C</sup>	72,51±0,59 <sup>a, D</sup>	68,72±2,49 <sup>a, B, C</sup>	65,80±0,98 <sup>a, B</sup>	21,04±0,26 <sup>b, A</sup>	0,585	***
865	73,11±2,81 <sup>a-c, C</sup>	75,91±1,27 <sup>b, c, C</sup>	74,41±0,57 <sup>b, c, C</sup>	68,84±0,98 <sup>b, B</sup>	20,98±1,62 <sup>b, A</sup>	0,560	***
600	73,33±0,47 <sup>b, C</sup>	73,83±2,00 <sup>a, b, C</sup>	73,95±0,37 <sup>b, C</sup>	69,31±1,19 <sup>b, B</sup>	22,31±3,55 <sup>b, A</sup>	0,552	***
400	74,73±0,61 <sup>c, C</sup>	76,43±0,33 <sup>c, D</sup>	75,33±0,58 <sup>c, C</sup>	59,19±5,31 <sup>a, B</sup>	16,47±0,28 <sup>a, A</sup>	0,66	***
<b>L*</b>							
1000	68,74±3,96 <sup>a, A</sup>	71,98±1,27 <sup>a, A</sup>	75,20±2,34 <sup>b, B, C</sup>	72,74±0,60 <sup>c, A, B</sup>	75,09±0,74 <sup>a, C</sup>	0,398	***
865	68,81±2,61 <sup>a, A</sup>	70,13±1,73 <sup>a, A, B</sup>	72,44±1,62 <sup>a, b, B</sup>	70,43±0,42 <sup>a, A</sup>	74,94±1,08 <sup>a, C</sup>	0,449	***
600	69,55±3,25 <sup>a, A</sup>	74,91±1,54 <sup>a, A</sup>	70,53±1,95 <sup>a, A</sup>	71,56±0,96 <sup>b, A</sup>	75,79±2,23 <sup>a, B</sup>	0,165	**
400	71,16±3,62 <sup>a, A</sup>	73,11±0,29 <sup>b, A</sup>	73,52±0,00 <sup>b, A</sup>	74,11±1,15 <sup>c, A</sup>	78,99±0,18 <sup>b, B</sup>	0,562	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-E</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

O parâmetro a\* apresenta o desvio da cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos), logo, verifica-se que durante o aumento do tempo de aquecimento em micro-ondas, esta tonalidade apresenta-se com valores mais positivos, indicando assim perda dos pigmentos de clorofila que são responsáveis pela coloração verde. Os pigmentos de clorofila existentes nos azeites são degradados durante o

processamento térmico, o que já foi comprovado no presente estudo. Ainda, é evidente que maiores tempos de aquecimento levaram a maiores perdas desses compostos e consequentemente valores mais positivos para a tonalidade  $a^*$  nos maiores tempos de aquecimento ( $t = 10_{\min}$ ).

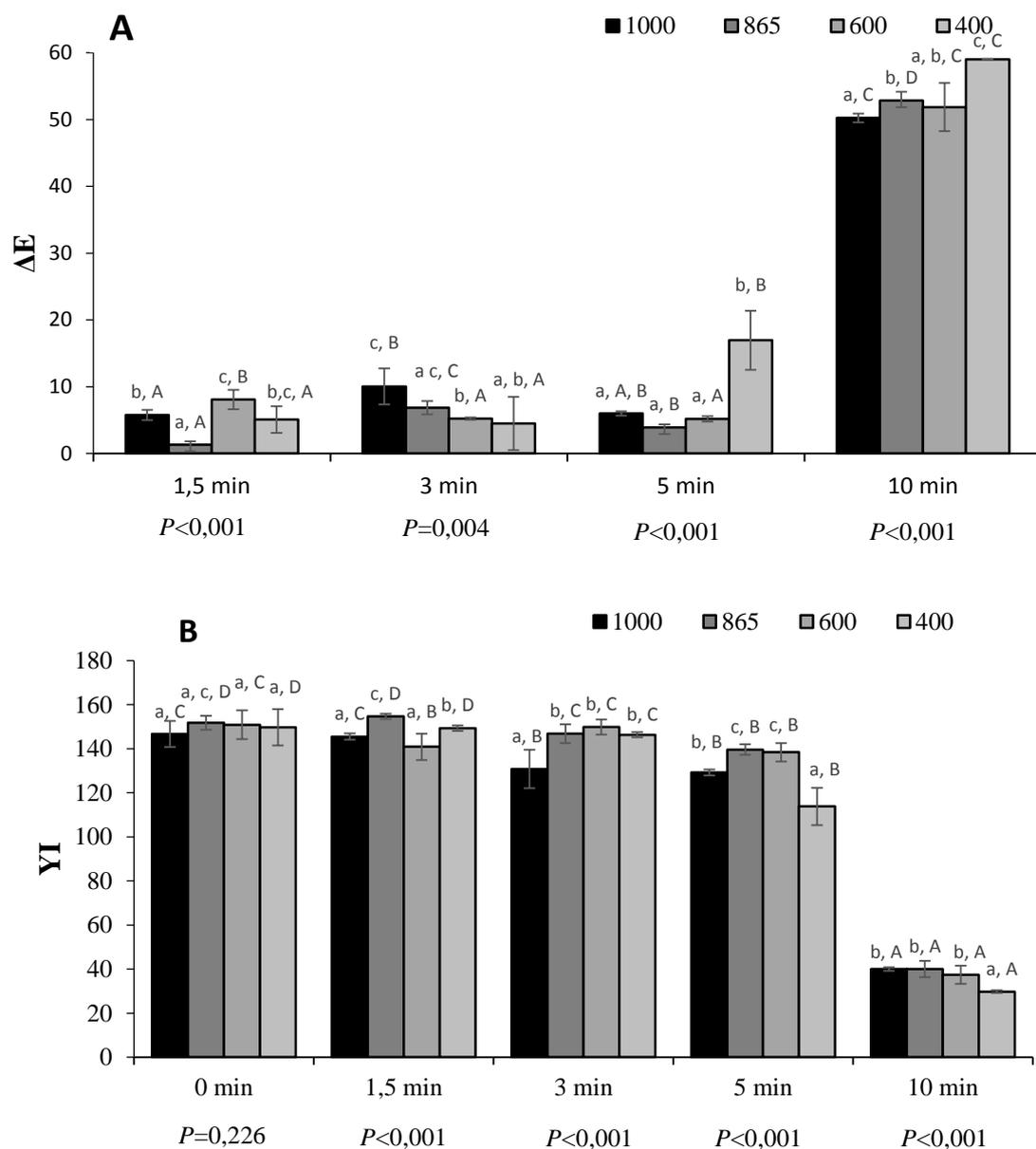
De uma forma geral, o aquecimento em micro-ondas induziu a alterações significativas ( $P < 0,001$ ) na tonalidade  $a^*$  nos diferentes azeites avaliados, deixando claro a influência do teor inicial de fenóis, uma vez que em  $t = 0_{\min}$  as amostras não apresentavam diferenças estatísticas ( $P = 0,294$ ).

Já o parâmetro  $b^*$  apresenta o desvio da cor entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos). No presente estudo as amostras apresentaram uma tonalidade amarela superior nos menores tempos ( $t = 0_{\min}$ ), diminuindo com o aquecimento, o que estará relacionado com a degradação devido as altas temperaturas de compostos responsáveis pela cor amarela, neste caso, pela degradação dos carotenoides. Ficou claro, assim como para as clorofilas, que o teor desses pigmentos em azeites aquecidos são alterados e neste caso reduzidos devido as degradações sofridas, influenciando diretamente a cor dos azeites.

Com relação ao parâmetro  $L^*$  que mede a luminosidade e varia entre zero (preto) e cem (branco), aumentou gradualmente com o aquecimento.

De modo geral, para todos os parâmetros ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) verificou-se correlações altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre as tonalidades e o tempo de aquecimento em micro-ondas (Quadro 8).

As diferenças de cor (AE) entre o controle (azeites não tratados termicamente) e azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas, assim como o índice de amarelidade (YI) foram calculados através dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e podem ser observados através da Figura 16.



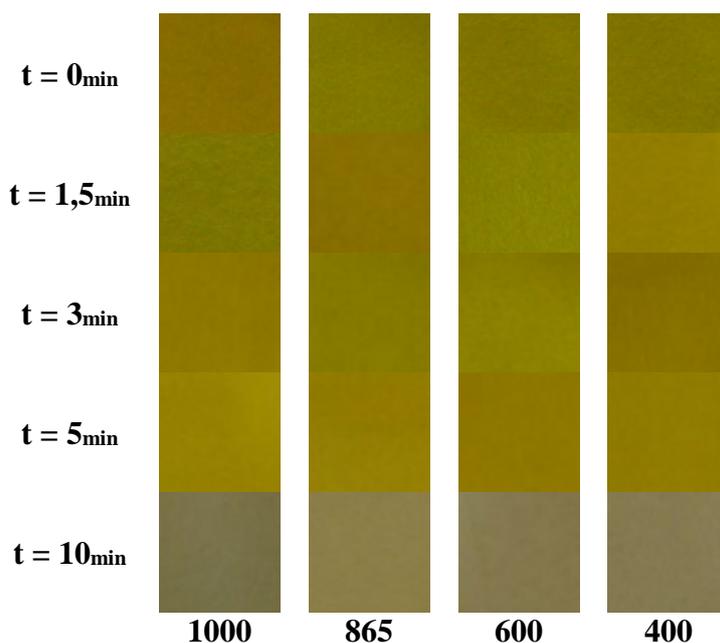
**Figura 16.** Diferença de cor  $\Delta E$  (A) e índice de amarelidade (B) de azeites submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média $\pm$ desvio padrão;  $n = 3$ ). <sup>a-c</sup> Nas colunas, diferentes letras minúsculas indicam que as amostras com diferentes teores de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação um tempo de aquecimento ( $P < 0,05$ ). <sup>A-D</sup> Diferentes letras maiúsculas indicam que as amostras com mesmo teor inicial de fenóis são significativamente diferentes entre si em relação aos diferentes tempos de aquecimento ( $P < 0,05$ ).

Ambos os dados,  $\Delta E$  e YI indicam que as principais mudanças de cor foram produzidas no fim do processamento térmico quando o azeite foi aquecido em micro-ondas a  $t = 10_{\text{min}}$ . É visível que nos azeites com menores teores iniciais de fenóis totais, a diferença na cor em relação ao controle foi maior, quando comparada aos azeites com maiores teores de fenóis totais. Ainda, em concordância com os resultados obtidos sobre

o parâmetro  $b^*$  (Quadro 9), é possível verificarmos uma maior diminuição do índice de amarelidade nos azeite em  $t = 10_{\text{min}}$ .

Ainda, para o aquecimento em micro-ondas observou-se uma correlação positiva, altamente significativa, ( $P < 0,001$ ) para todas as amostras, ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma maior diferença de cor em relação ao controle ( $\Delta E$ ): 1000 mg/kg ( $y = 14,369x - 16,700$ ); 865 mg/kg ( $y = 16,705x - 24,240$ ); 600 mg/kg ( $y = 14,744x - 17,918$ ); 400 mg/kg ( $y = 17,422x - 22,163$ ). Para o índice de amarelidade, verificou-se uma correlação negativa, altamente significativa, logo, reportou-se um menor índice com o aumento do aquecimento.

Com relação ao parâmetro  $b^*$  e  $L^*$ , os resultados obtidos foram semelhantes aos de  $a^*$ , ou seja, não ficou evidenciado grandes alterações nesses parâmetros ao longo dos diferentes tempos de aquecimento. A maior diferença nesses parâmetros comparativamente em relação ao aquecimento em micro-ondas pode ser analisado através da Figura 17, na qual fica perceptível a grande diferença ocasionada nos azeites aquecidos a  $t = 10_{\text{min}}$ , quando comparada a outros tempos de aquecimento e ao controle.



**Figura 17.** Apresentação visual dos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas. Teor em fenóis (1000, 865, 600 e 400) é expresso em mg/kg de azeite.

Globalmente, ocorreu uma descoloração intensiva apenas nos azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas, principalmente em  $t = 10_{\text{min}}$ . Esta descoloração ocorre durante uma fase avançada de oxidação, logo, pode-se presumir que a qualidade do óleo

deteriorou-se completamente, pois, segundo Bansal et al. (2010), a mudança na coloração de óleos é o resultado combinado de oxidação, polimerização e outras mudanças químicas.

Em estudo realizado por Sánchez-Gimeno et al. (2008), azeite virgem extra e óleo de girassol foram submetidos a processo de fritura em uma fritadeira doméstica a 170°C com uma proporção de 200g de batata/ 4L de óleo durante cerca de 3 min. Após o processamento térmico verificaram que em ambos os óleos ocorreram mudanças em sua coloração. Para o parâmetro  $b^*$ , foi observado um incremento em seu valor para ambos os óleos, indicando assim uma coloração mais amarela. Com relação a luminosidade, o azeite virgem extra, apresentou ao longo do processamento térmico um maior valor, indicando assim uma maior luminosidade, diferentemente do óleo de girassol, que apresentou um valor de  $L^*$  menor no fim do processo de fritura. Segundo Bansal et al. (2010), o escurecimento de óleos está relacionado com a presença de ácidos gordos oxidados e alimento carbonizado.

#### **4.4. Atividade antioxidante**

##### **4.4.1. Atividade sequestradora do radical DPPH**

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH, sendo este um dos ensaios mais comuns usados na avaliação do antioxidante (Tan & Lim, 2015).

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura, podendo ser monitorizado através de espectrofotometria (Tan & Lim, 2015). Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não deteta substâncias pró-oxidantes. A diminuição da absorbência das amostras correlacionado ao decaimento da absorbência do branco resulta na percentagem de sequestro de radicais livres (percentagem de inibição).

A percentagem de inibição do radical livre DPPH em azeites submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas é apresentada na Quadro 10.

**Quadro 10.** Percentagem de inibição do radical livre DPPH em azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

Fenóis totais	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	0	1,5	3	5	10		
1000	82,73±1,10 <sup>d,D</sup>	66,89±1,80 <sup>d,C</sup>	67,23±1,84 <sup>d,C</sup>	53,20±6,89 <sup>c,B</sup>	38,42 ±3,22 <sup>c,A</sup>	0,894	***
865	68,76±0,70 <sup>c,E</sup>	55,53±0,64 <sup>c,D</sup>	52,90±1,19 <sup>c,C</sup>	45,71±0,35 <sup>c,B</sup>	27,99±1,00 <sup>b,A</sup>	0,963	***
600	56,54±1,41 <sup>b,D</sup>	47,60±2,78 <sup>b,C</sup>	44,76±0,89 <sup>b,C</sup>	34,84±1,68 <sup>b,B</sup>	16,88±1,48 <sup>a,A</sup>	0,977	***
400	51,70±0,92 <sup>a,E</sup>	42,64±0,51 <sup>a,D</sup>	38,90±0,43 <sup>a,C</sup>	38,90±0,43 <sup>a,B</sup>	16,59±0,45 <sup>a,A</sup>	0,949	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-E</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

Em azeites não aquecidos observou-se uma percentagem inicial de inibição de 83 e 52%, para os maiores e os menores teores iniciais de fenóis totais respetivamente, com diferenças significativas entre as amostras ( $P<0,001$ ) (Quadro 3). Globalmente, para os diferentes tempos de aquecimento, observou-se uma influência direta entre o teor de fenóis totais iniciais e a percentagem de inibição do radical DPPH•, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P<0,001$ ) entre as amostras, sempre com valores mais elevados para os azeites com 1000 mg/kg.

Os azeites com maiores teores de fenóis totais, nomeadamente 1000 mg/kg, apresentou uma redução de 44 na sua percentagem da capacidade em sequestrar o radical DPPH•, quando submetido a aquecimento em micro-ondas em  $t = 10_{\text{min}}$ . Nas amostras com 400 mg/kg verificaram-se perdas de 35.

As amostras de azeites com 865 e 400 mg/kg de fenóis, submetidas ao aquecimento apresentaram diferenças significativas em todos os tempos de aquecimento quando comparado ao controle ( $P<0,001$ ), indicando assim, que à partir do menor tempo de aquecimento ( $t = 1,5_{\text{min}}$ ) o azeite pode ter sua qualidade e sua capacidade antioxidante alterada. Em azeites com 1000 e 600 mg/kg verificou-se que em  $t = 1,5_{\text{min}}$  e  $t = 3_{\text{min}}$ , a percentagem de inibição permaneceu praticamente inalterada, quando comparada ao controle e aos azeites aquecidos a  $t = 5_{\text{min}}$  e  $t = 10_{\text{min}}$ .

Nos resultados obtidos verificou-se também uma correlação negativa, altamente significativa ( $P<0,001$ ) para as amostras com 1000 mg/kg ( $y=-4,165x+77,930$ ); 865 mg/kg ( $y=-03,78x+64,940$ ); 600 mg/kg ( $y=-3,88x+55,260$ ); 400 mg/kg ( $y=-$

3,54x+49,322), ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma diminuição na sua atividade antioxidante, ou seja, na porcentagem de inibição do radical DPPH•.

Kalantzakis et al. (2006) que examinaram a perda da capacidade antioxidante em vários óleos vegetais a 180°C durante um período de 10 horas. Foi observado que o azeite perdeu a capacidade em sequestrar o radical livre DPPH em um curto tempo de aquecimento em relação ao óleo de soja, girassol, semente de algodão e óleo comercial para fritar.

#### **4.5. Efeito do aquecimento em micro-ondas na estabilidade oxidativa de azeites**

Estabilidade oxidativa é conhecida como a resistência a processos de oxidação. Em condições normais de aquecimento, o processo de oxidação ocorre lentamente, até que se observa um aumento súbito na taxa de oxidação (período de indução) proporcional ao tipo de ácido gordo encontrado, bem como pela presença de antioxidantes. Experiências usando alta temperatura, na presença de excesso de ar, são normalmente realizados para calcular e comparar o período de indução de diferentes lípidos (Malheiro et al., 2011).

A oxidação lipídica é considerada a maior causa de deterioração de azeites, afetando as suas características químicas, funcionais, nutricionais e sensoriais, provocando o aparecimento de sabores e odores desagradáveis, limitando a vida útil do azeite, ou seja, a estabilidade oxidativa de um azeite permite-nos ter uma ideia do seu tempo de prateleira.

De uma forma geral, azeites com maiores teores iniciais de fenóis totais são mais resistente a oxidação lipídica. A estabilidade oxidativa dos azeites aquecidos em micro-ondas está representado no Quadro 11.

Em azeites não aquecidos (controle) obteve-se 13,2 e 8,1h, para os maiores e os menores teores iniciais de fenóis totais respectivamente, com diferenças significativas entre as amostras ( $P < 0,001$ ). De modo geral, para os diferentes tempos de aquecimento, observou-se uma influência direta entre o teor em fenóis totais e o tempo de resistência a oxidação, pois, independentemente do tempo de aquecimento, houve diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) entre as amostras, sempre com valores mais elevados para os azeites com 1000 mg/kg.

**Quadro 11.** Estabilidade oxidativa (horas) de azeites com diferentes níveis iniciais de compostos fenólicos submetidos a diferentes tempos de aquecimento em micro-ondas (média±desvio padrão; n = 3).

Fenóis totais	Tempo (min)					R <sup>2</sup>	P
	0	1,5	3	5	10		
1000	13,18±0,17 <sup>d, C</sup>	12,59±0,75 <sup>c, B, C</sup>	12,71±0,06 <sup>d, C</sup>	11,92±0,35 <sup>d, B</sup>	9,52±0,27 <sup>c, A</sup>	0,844	***
865	12,61±0,29 <sup>c, D</sup>	12,33±0,17 <sup>c, C, D</sup>	11,84±0,65 <sup>c, C, B</sup>	11,31±0,20 <sup>c, B</sup>	9,32±0,33 <sup>c, A</sup>	0,906	***
600	11,10±0,21 <sup>b, C</sup>	10,7±0,95 <sup>b, C</sup>	11,02±0,5 <sup>b, C</sup>	8,85±0,30 <sup>b, B</sup>	6,36±0,55 <sup>b, A</sup>	0,886	***
400	8,14±0,17 <sup>a, C</sup>	8,09±0,2 <sup>a, C</sup>	7,97±0,12 <sup>a, C</sup>	6,73±0,3 <sup>a, B</sup>	4,2±0,2 <sup>a, A</sup>	0,919	***

<sup>a-d</sup> Dentro da mesma coluna valores médios com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); <sup>A-D</sup> Dentro da mesma linha valores médios com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ); n.s.: correlação não significativa; \* $P\leq 0,05$ : correlação significativa; \*\* $P\leq 0,01$ : correlação muito significativa; \*\*\* $P\leq 0,001$ : correlação altamente significativa.

A partir  $t = 3_{\text{min}}$  de aquecimento, observou-se que independentemente do teores iniciais de fenóis dos controles, os antioxidantes deixam de exercer influencia positiva sobre a estabilidade oxidativa do azeite, pois, somente em  $t = 5_{\text{min}}$  e  $t = 10_{\text{min}}$  de aquecimento, obteve-se diferenças significativas ( $P<0,001$ ) em relação aos azeites com  $t = 0_{\text{min}}$  de aquecimento. No que respeita aos azeites com 1000 mg/kg a perda de estabilidade oxidativa foi cerca de 28% comparando azeite sem aquecimento e em  $t = 10_{\text{min}}$ . Nas restantes amostras verificaram-se perdas de estabilidade oxidativa na ordem dos 26%, 43% e 48%, respetivamente nas amostras de 865, 600 e 400 mg/kg. Claramente a perda de estabilidade oxidativa foi superior nas amostras com menor teor inicial de fenóis o que indica claramente o poder antioxidante dos compostos fenólicos. Nos resultados obtidos também se verificou uma correlação negativa para todas as amostras (Quadro 11), ou seja, com o aumento do tempo de aquecimento foi verificado uma diminuição da estabilidade oxidativa: 1000 mg/kg ( $y=-0,351x+13,38$ ); 865 mg/kg ( $y=-0,33x+12,789$ ); 600 mg/kg ( $y=-0,510x+11,601$ ); 400 mg/kg ( $y=-0,406x+8,572$ ).

De modo geral, é claramente visível que em azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas em  $t = 5$  e  $t = 10_{\text{min}}$  houve maiores perdas na estabilidade oxidativa. Albi et al. (1997a) comparou o aquecimento em micro-ondas e em forno convencional de óleos vegetais (óleo de girassol, óleo de girassol rico em oleico e azeite) e verificou que azeites virgens submetidos a aquecimento em forno convencional a uma temperatura de  $180\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 120 min, teve uma redução em sua estabilidade oxidativa inferior em relação aos azeites submetidos a aquecimento em micro-ondas durante 120 min, com

intervalos de 50 s, sem permitir que a temperatura exceda os 40°C. A redução foi de 10% e 15% para o forno convencional e micro-ondas, respectivamente. Ainda, em relação aos outros óleos vegetais, o azeite virgem foi o que obteve melhor desempenho contra a oxidação principalmente devido à sua composição que inclui compostos minoritários como os antioxidantes (compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis).

Azeite virgem das cultivares Picual e Arbequina foram aquecidas a 180±1°C durante 1,5, 3, 5, 10, 15, 20 e 25 h e verificou-se menores tempos de indução ao longo dos diferentes tempos de aquecimento. Relatou-se reduções de 85 e 88% para a cultivar Picual e Arbequina respectivamente. As mesmas cultivares foram também aquecidas em micro-ondas durante 5 e 10 minutos a 0,5KW, e verificou-se reduções 20% para a Picual e 50% para Arbequina (Brenes et al., 2002).

Claramente é visível que os azeites com maiores quantidades iniciais de fenóis totais, apresentaram maior resistência à oxidação, ou seja, maiores tempos de indução.

O aquecimento em micro-ondas acarreta mudanças significativas nos azeites, com relação a sua cor, aos parâmetros de qualidade, em sua composição e também apresentam mudanças importantes na estabilidade e, portanto, na vida de prateleira dos azeites

O aquecimento proporcionou perda da qualidade dos azeites com diferentes teores iniciais de fenóis devido a aceleração do processo oxidativo. Ao analisarmos os resultados obtidos para os índices de peróxidos é possível observarmos um incremento considerável neste parâmetro, indicando assim, um aumento no número de hidroperóxidos formados a partir de ácidos gordos insaturados. Essa perda de qualidade devido ao aumento de hidroperóxidos formados, ou seja, devido a formação de produtos da oxidação primária, acarretou em modificações na composição química das amostras seja a ela a nível de ácidos gordos, bem como a nível de compostos fenólicos e/ou compostos com atividade antioxidante.

É possível verificarmos uma diminuição considerável nos teores de compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis, pigmentos e outros compostos que possuem atividade antioxidante devido ao aumento da oxidação. Durante este processo verifica-se a ocorrência de inúmeras reações com formação de radicais livres durante a fase de propagação. Devido a sua atividade antioxidante, ou seja, devido a sua capacidade em sequestrar radicais livres, muitos desses compostos são perdidos durante este processo.

A perda desses compostos refletem diretamente sobre a atividade antioxidante das amostras. Ao observarmos os resultados obtidos através da atividade sequestradora do radical livre DPPH é possível verificarmos o decréscimo desta capacidade.

A perda de atividade antioxidante, da qualidade e as alterações ocorridas na composição dos azeites, refletem diretamente sobre a sua estabilidade oxidativa. Estes parâmetros estão intrinsecamente relacionados com as mudanças provocadas nos componentes minoritários do azeite, entre eles, os compostos fenólicos que contribuem na estabilidade dos azeites, indicando assim, uma influência positiva destes compostos sobre os diversos parâmetros analisados nos azeites aquecidos.





# ***CAPÍTULO 5***

---

**Conclusão**



## 5. Conclusão

O presente trabalho pretendeu avaliar se o efeito do teor inicial em fenóis totais presentes no azeite virgem extra afetava o comportamento deste óleo quando aquecido em micro-ondas. Assim, as conclusões deste trabalho foram:

- Nos tempos iniciais de aquecimento, os azeites com maiores teores em micro-ondas conservavam melhor os atributos sensoriais positivos comparativamente aos azeites com menor teor destes compostos, contudo a partir dos três minutos de aquecimento não se verificou qualquer efeito, comportando-se todos os azeites da mesma forma;
- O teor total em fenóis totais influenciou positivamente na proteção contra a oxidação dos azeites; no azeite com maior teor em fenóis totais, e com valores de peróxido semelhantes em  $t = 0_{\min}$ , e apesar de aumentar com o aquecimento, manteve-se sempre mais baixo que nos azeites com menores teores destes compostos;
- Os azeites com maiores teores em fenóis totais protegeram o óleo da formação de ácidos gordos *trans*, uma vez que comparativamente aos azeites com menor teor em fenóis totais, os ácidos gordos *trans* aumentaram de uma forma muito menos pronunciada; contudo, relativamente aos ácidos gordos individuais e às suas diferentes classes (Saturados, monoinsaturados e polinsaturados) pareceu não haver qualquer comportamento diferenciado relativamente ao teor em fenóis totais;
- No que respeita aos esteróis, quer nos seus teores totais quer nos esteróis individuais, não se notou qualquer efeito na proteção destes compostos;
- Nos tocoferóis o comportamento com o aquecimento foi semelhante, mas nos tempos finais, os azeites com maiores teores iniciais de fenóis totais conservaram mais os tocoferóis do que nos com menos fenóis totais;
- Nos teores em esqualeno e carotenoides não foram detetadas diferenças, enquanto os teores em clorofilas não decaíram tão pronunciadamente nos azeites com mais teores de fenóis totais;
- A perda relativa de fenóis totais foi superior nos lotes com maiores teores de fenóis totais em comparação com os restantes apesar de nos tempos finais de aquecimento, quer os teores em fenóis totais quer em tirosol e hidroxitirosol se manterem a concentrações significativamente superiores nos azeites com maiores teores iniciais de fenóis totais;

- Na cor apesar do efeito não ter sido evidente, parece ter havido alguma proteção na perda de cor, nos azeites com maiores teores em fenóis totais;
- Na atividade antioxidante a perda com o aquecimento não foi tão pronunciada nos azeites com maiores teores iniciais de fenóis totais, ocorrendo um comportamento semelhante com a resistência à oxidação medida pelo método rancimat.

## 6. REFERÊNCIAS

- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A., & Avallone, S. (2010). Kinetic study of b-carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*, 349–361.
- Albi, T., Lanzón, A., Guinda, A., León, M., & Pérez-Camino, M. C. (1997a). Microwave and conventional heating effects on thermoxidative degradation of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3795–3798.
- Albi, T., Lanzón, A., Guinda, A., Pérez-Camino, M. C., & Leon, M. (1997b). Microwave and conventional heating effects on some physical and chemical parameters of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3000-3003.
- Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J. J., Uceda, M., & Beltrán, G. (2007). How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*, 9646-9654.
- Andrewes, P., Busch, J. L., de Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1415-1420.
- Angerosa, F. (2000). Sensory quality of olive oils. J. Harwood, R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties*, Aspen publications, Inc, Gaithersburg, Maryland, USA, 355-392.
- Attya, M., Benabdelkamel, H., Perri, E., Russo, A., & Sindona, G. (2010). Effects of conventional heating on the stability of major olive oil phenolic compounds by tandem mass spectrometry and isotope dilution assay. *Molecules*, *15*, 8734-8746.
- Baccouri, O., Cerrentani, L., Bendini, A., Caboni, M.F., Zarrouk, M., Pirrone, L. e Miled, D.D.B. (2007). Preliminary chemical characterization of Tunisian monovarietal virgin olive oils and comparison with Sicilian ones. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*, 1208-1217.
- Bansal, G., Zhou, W., Barlow, P. J., Lo, H. L., & Neo, F. L. (2010). Performance of palm olein in repeated deep frying and controlled heating processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *121*, 338-347.
- Boskou, D., (2011). Olive oil. Gunstone, F. D. (Ed). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*, Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, 243-268.
- Bremner, H. A. (2000). Toward practical definitions of quality for food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*, 83-90.
- Capannesi, C., Palchetti, I., & Mascini, M. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*, 553-562.

- Caponio, F., Bilancia, M. T., Pasqualone, A., Sikorska, E., & Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221, 92-98.
- Caponio, F., Pasqualone, A., & Gomes, T. (2002). Effects of conventional and microwave heating on the degradation of olive oil. *European Food Research and Technology*, 215, 114-117.
- Caponio, F., Pasqualone, A., & Gomes, T. (2003). Changes in the fatty acid composition of vegetable oils in model doughs submitted to conventional or microwave heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 38, 481-486.
- Carrasco-Pancorbo, A., Villalba, G. R., Zarrouk, W., & Gutiérrez, A.F. (2009). Calidad sensorial del aceite de oliva. El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Granada, 225-246.
- Casal, S., Malheiro, R., Sendas, A., Oliveira, B. P. P., & Pereira, J. A. (2010). Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2972-2979.
- Charoenprasert, S.; Mitchell, A. (2012) Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7081-7095.
- Chiavaro, E., Rodriguez-Estrada, M. T., Vittadini, E., & Pellegrini, N. (2010). Microwave heating of different vegetable oils: Relation between chemical and thermal parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1104-1112.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-186.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 129-135.
- Cicerale, S., Lucas, L. J., & Keast, R. S. J. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 458-479.
- Cinquanta, L., Esti, M., & Di Matteo, M. (2001). Oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 1197-1202.
- Criado, M.N., Romero, M.P., Casanovas, M., & Motilva, M.J. (2008). Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 110, 873-880.
- Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351-3356.
- Dairi, S., Galeano-Díaz, T., Acedo-Valenzuela, M. I., Godoy-Caballero, M. P., Dahmoune, F., Remini, H., & Madani, K. (2015). Monitoring oxidative stability and

phenolic compounds composition of myrtle-enriched extra virgin olive during heating treatment by flame, oven and microwave using reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction (RP-DLLME)-HPLC-DAD-FLD method. *Industrial Crops and Products*, 65, 303-314.

D'Evoli, L., Huikko, L., Lampi, A. M., Lucarini, M., Lombardi-Boccia, G., Nicoli, S., & Piironen, V. (2006). Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 818-823.

Dias, L. G., Fernandes, A., Veloso, A. C., Machado, A. A., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2014). Single-cultivar extra virgin olive oil classification using a potentiometric electronic tongue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 160, 321-329.

El-Abassy, R. M., Materny, A., & Donfack, P. (2011). Assessment of Microwave versus Conventional Heating Induced Degradation of Olive Oil by VIS Raman Spectroscopy and Classical Methods. InTech.

Farhoosh, R., Khodaparast, M. H. H., Sharif, A., & Rafiee, S. A. (2012). Olive oil oxidation: rejection points in terms of polar, conjugated diene, and carbonyl values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 131, 1385-1390.

Frankel, E. N. (2011). Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 785-792.

Frankel, E. N. (2012). Free radical oxidation. Lipid oxidation, Woodhead publishing limited, Cambridge, Reino Unido, 15-23.

Gordon, M. H., Paiva-Martins, F., & Almeida, M. (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2480-2485.

Guillén, N., Acín, S., Navarro, M. A., Surra, J. C., Arnal, C., Lou-Bonafonte, J. M., & Osada, J. (2009). Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E. *Revista Española de Cardiología*, 62, 294-304.

Guiné, R. & Henriques, F. (2011). O Papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimentos sobre o modo como influenciam a Saúde. *Millenium*, 40, 7-21.

Hassanein, M. M., El-Shami, S. M., & Hassan El-Mallah, M. (2003). Changes occurring in vegetable oils composition due to microwave heating. *Grasas y Aceites*, 54, 343-349.

Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., & Dais, P. (2008). Determination of phospholipids in olive oil by 31P NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 6232-6240.

Inarejos-García, A. M., Santacatterina, M., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Gómez-Alonso, S. (2010). PDO virgin olive oil quality-Minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International*, 43, 2138-2146.

International Olive Council, IOC Mario Solinas Quality Award – Rules of the International Competition for Extra Virgin Olive Oils. T.30/Doc. No. 17 (<http://www.internationaloliveoil.org/>), 2014, 9. (acedido em 27.09.15).

International Olive Council, Sensory Analysis of Olive Oil – Method for the Organoleptic Assessment of Virgin Olive Oil. COI/T.20/Doc. No 15/Rev. (<http://www.internationaloliveoil.org/>), 2013, 18. (acedido em 27.09.15).

ISO 9936 (2006). Animal and vegetable fats and oils - determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.

Jones, D. A., Lelyveld, T. P., Mavrofidis, S. D., Kingman, S. W., & Miles, N. J. (2002). Microwave heating applications in environmental engineering-a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 34, 75-90.

Kalantzakis, G., Blekas, G., Pegklidou, K., & Boskou, D. (2006). Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 329-335.

Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 100, 273-286.

Kamal-Eldin, A., & Budilarto, E. (2015). Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation. F. Shahidi (Ed.), *Handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead publishing limited, Cambridge, Reino Unido.141-159.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.

Mahmoud, E. A. E. M., El-Moneim, A., Dostalova, J., Pokorny, J., Lukesova, D., & Dolezal, M. (2009). Oxidation of olive oils during microwave and conventional heating for fast food preparation. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 173-177.

Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating?. *Food Research International*, 48, 148-154.

Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E., Pereira, J. A., (2011). Microwave heating: A time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation?. S. Grundas (Ed.), *Advances in induction and microwave heating of mineral and organic materials*, InTech, Rijeka, Croatia, 597-614.

Malheiro, R., Oliveira, I., Vilas-Boas, M., Falcão, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2009). Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 92-97.

Malheiro, R., Rodrigues, N., & Pereira, J. A. (2015). Olive Oil Phenolic Composition as Affected by Geographic Origin, Olive Cultivar, and Cultivation Systems. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, 1, 93-121.

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 65, 1270-1283.

Minguez-Mosquera, M.I., Rejano, L., Gandul, B., Sanchez, A.H. and Garrido, J. (1991) Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 322-337.

Morelló, J. R.; Motilva, M. J.; Tovar, M. J.; Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on phenolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 85, 357-364.

Moreno, M. M., Olivares, D. M., López, F. A., Adelantado, J. G., & Reig, F. B. (1999). Determination of unsaturation grade and trans isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR. *Journal of Molecular Structure*, 482, 551-556.

Mulinacci, N., Giaccherini, C., Ieri, F., Innocenti, M., Romani, A., & Vincieri, F. F. (2006). Evaluation of lignans and free and linked hydroxy-tyrosol and tyrosol in extra virgin olive oil after hydrolysis processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 757-764.

Mutyala, S., Fairbridge, C., Paré, J. J., Bélanger, J. M., Ng, S., & Hawkins, R. (2010). Microwave applications to oil sands and petroleum: A review. *Fuel Processing Technology*, 91, 127-135.

Nissiotis, M., & Tasioula-Margari, M. (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 77, 371-376.

Oghbaei, M., & Mirzaee, O. (2010). Microwave versus conventional sintering: a review of fundamentals, advantages and applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 494, 175-189.

Paraskevopoulou, D.; Boskou, D.; Paraskevopoulou, A. (2007), Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 101, 1197–1204.

Pardo, J.E., Cuesta, M.A. e Alvarruiz, A. (2007) Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin “Aceite Campo de Montiel” (Ciudad Real, Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 100, 977-984.

Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S., & Brighenti, F. (2001). Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2532-2538.

Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 716-721.

Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 722-727.

Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., & Quiles, J.L. (2006). Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. Olive oil and health. Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, M. C & Yaqoob, P. (Eds.). CAB International: Cambridge, 45-62.

Regulamento (CE) nº 1830/2015 de 8 de Julho de 2015. Sobre as características do azeite e óleo de bagaço de azeitona e sobre os métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial L*, 266/9.

Regulamento (CE) nº 1833/2015 de 12 de Outubro de 2015. Sobre as características do azeite e óleo de bagaço de azeitona e sobre os métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial L*, 266/29.

Regulamento (CE) nº 2568/91 de 11 de Julho de 1991. Sobre as características do azeite e óleo de bagaço de azeitona e sobre os métodos de análises relacionados. *Jornal Oficial L*, 248/1.

Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 881-888.

Romero, C., & Brenes, M. (2012). Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9017-9022.

Saba, A., Mazzini, F., Raffaelli, A., Mattei, A., & Salvadori, P. (2005). Identification of 9 (E), 11 (E)-18: 2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4867-4872.

Saldanha, M. H. (1999). Benefícios do azeite na saúde humana. Lisboa, Portugal: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Sánchez, J. L., Carretero, A.S., & Gutiérrez, A.F. (2009). Composición del aceite de oliva. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*, Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Granada, 195-224.

Sánchez-Gimeno, A. C., Negueruela, A. I., Benito, M., Vercet, A., & Oria, R. (2008). Some physical changes in Bajo Aragón extra virgin olive oil during the frying process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 110, 654-658.

Santos, C. S., Cruz, R., Cunha, S. C., & Casal, S. (2013). Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*, 54, 2016-2024.

Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 7-30.

Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.

Tan, J. B. L., & Lim, Y. Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 172, 814-822.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98-112.

Tuck, K. L., & Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13, 636-644.

Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea L.*) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, 118, 139-148.

Vadivambal, R., & Jayas, D. S. (2010). Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials - a review. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 161-171.

Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 661-676.

Veloso, A. C., Dias, L. G., Rodrigues, N., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2015). Sensory intensity assessment of olive oils using an electronic tongue. *Talanta*.

Visioli, F., Poli, A., & Galli C (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22, 65-75.

Youssef, N. B., Zarrouk, W., Carrasco-Pancorbo, A., Ouni, Y., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Zarrouk, M. (2010). Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 199-204.

Zamora, R., Olmo, C., Navarro, J. L., & Hidalgo, F. J. (2004). Contribution of phospholipid pyrrolization of the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4166-4171.