

Sandra Marisa Sousa Santos

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE METAIS EM AZEITES E AZEITONAS DA CV COBRANÇOSA

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por
Professora Doutora Ana Barros

Julho, 2014

“ As doutrinas expressas são da exclusiva responsabilidade do autor”.

Dedicada à minha Mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Raquel Guiné, minha orientadora, pela ajuda ao longo do trabalho, pelo profissionalismo, competência, incentivo e pelos conhecimentos transmitidos

À Professora Doutora Ana Barros pela ajuda, orientação, por me fornecer todos os meios para que este trabalho fosse possível, e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Ao Sr. Carlos Matos, técnico de laboratório de águas do departamento de química, por toda a dedicação, tempo, preocupação, disponibilidade e ajuda fundamental no laboratório.

À minha mãe, que sempre me apoiou e ajudou a encontrar força para realizar todos os meus sonhos, e por acreditar em mim indefinidamente.

Ao meu pai, irmã e namorado, por estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos, pelas palavras de conforto e encorajadoras que me deram ânimo para continuar.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, pela paciência, incentivo e amizade com que sempre pude contar.

RESUMO

A olivicultura possui uma grande importância no cenário económico mundial, devido ao facto de a azeitona e o azeite fazerem parte da dieta alimentar de muitos países, especificamente os da região Mediterrânea.

A “Cobrançosa” é uma cultivar Portuguesa com muita importância na região de Trás-os-Montes encontrando-se atualmente disseminada por seis regiões de Denominação de Origem Protegida.

Os contaminantes emitidos para a atmosfera atingem as oliveiras e as azeitonas através da água, do ar, das plantas e do solo. Embora a ingestão de metais pesados através da azeitona e do azeite seja reduzida, a sua bioacumulação no organismo pode resultar em toxicidade e pôr em causa a saúde pública.

É deste ponto de vista, que se centra o objetivo geral deste trabalho.

Assim sendo, tentou-se quantificar o conteúdo de metais (de segurança e de qualidade), tais como o alumínio, arsénio, cádmio, chumbo, cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, níquel, e zinco nas azeitonas e azeites da cv “Cobrançosa” de seis clones em dois estados de maturação, com diferentes rendimentos de produção e diferentes atividades antioxidantes.

Verificou-se que todos os metais analisados se encontram de acordo com o legislado e publicado por outros autores, verificando-se neste estudo particular que a componente genética que diferencia as amostras em estudo, não está significativamente relacionada com o conteúdo em metais.

Palavras-chave: Azeitona, Azeite, Metais, Qualidade, Segurança.

ABSTRACT

The culture of the olive trees has a great importance in the world economic scenario, due to the fact that people in many countries, especially the Mediterranean ones, use the olives and olive oil in their daily diet.

The “Cobrançosa” is a portuguese cultivar that has an enormous importance in the Trás-os-Montes region. Nowadays this type of olive trees can be found in six regions called as Protect Origin Denomination.

The contaminants expelled to the atmosphere reach the olives and olive trees through the water, the air, the plants and the soil. Although the ingestion of the heavy metals contained in olives and olive oil is almost insignificant, it can be toxic because of the bioaccumulation in the human body and that can put at risk the public heath.

Bearing this in mind, the general goal of this study is to try to quantify the metal contents in olives and olive oils of the six clones, in two states of maturation, different production yield and antioxidant activity of cv “Cobrançosa”, such as: aluminium, arsenic, calcium, cadmium, cobalt, copper, iron, magnesium, manganese, sodium, nickel, lead and zinc.

It was found that all the analyzed metals are in accordance with the legislation and with works published by other authors, verifying that in this particular study the genetic component, which differentiates the samples analyzed, is not significantly related to the metal content.

Keywords: Olive, Olive Oil, Metals, Quality, Safety.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
Índice geral.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
<i>Capítulo 1. Introdução</i>	- 1 -
1.1. Enquadramento Temático	- 2 -
1.2. Revisão Bibliográfica	- 4 -
1.2.1. Azeitona	- 5 -
1.2.1.1. Botânica da Azeitona	- 5 -
1.2.1.2. Composição Química.....	- 6 -
1.2.1.3. Caracterização da Cultivar Cobrançosa.....	- 6 -
1.2.2. Azeite	- 8 -
1.2.2.1. Composição Química.....	- 8 -
1.2.2.2. Importância na Alimentação.....	- 9 -
1.2.2.3. Azeite em Portugal.....	- 11 -
1.2.2.4. Azeite DOP	- 11 -
1.2.3. Parâmetros de Qualidade e Segurança das Azeitonas e Azeite.....	- 13 -
1.2.3.1. Metais	- 13 -
1.2.3.2. Benéficos versus Prejudiciais	- 14 -
1.2.3.3. Metais relacionados com a Segurança	- 15 -
1.2.3.3.1. Alumínio.....	- 15 -
1.2.3.3.2. Arsénio	- 16 -
1.2.3.3.3. Cádmio	- 16 -
1.2.3.3.4. Chumbo	- 17 -
1.2.3.4. Metais relacionados com a Qualidade	- 17 -
1.2.3.4.1. Cálcio.....	- 17 -
1.2.3.4.2. Cobalto	- 18 -

1.2.3.4.3.	Cobre.....	- 18 -
1.2.3.4.4.	Ferro.....	- 18 -
1.2.3.4.5.	Magnésio.....	- 19 -
1.2.3.4.6.	Manganês.....	- 19 -
1.2.3.4.7.	Níquel.....	- 19 -
1.2.3.4.8.	Sódio.....	- 20 -
1.2.3.4.9.	Zinco.....	- 20 -
1.3.	Objetivos.....	- 21 -
 <i>Capítulo 2. Parte Experimental.....</i>		 - 22 -
2.1.	Amostragem.....	- 23 -
2.2.	Determinação de Metais.....	- 24 -
2.2.1.	Espectrofotometria de Absorção Atômica.....	- 25 -
2.2.1.1.	Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama.....	- 25 -
2.2.1.2.	Espectrofotometria de Absorção Atômica em Câmara de Grafite.....	- 26 -
2.2.3.	Espectrofotometria de Emissão Atômica.....	- 26 -
2.2.4.	Procedimento Experimental.....	- 27 -
2.3.	Análise Estatística.....	- 28 -
2.3.1.	Análise de Variância.....	- 28 -
2.3.2.	Análise Discriminante.....	- 28 -
 <i>Capítulo 3. Resultados e Discussão.....</i>		 30
3.1.	Resultados e Discussão.....	31
3.2.	Metais de Segurança e Metais de Qualidade.....	32
3.2.1.	Metais de Segurança.....	35
3.2.1.1.	Alumínio.....	35
3.2.1.2.	Chumbo.....	37
3.2.1.3.	Arsênio.....	38
3.2.1.4.	Cádmio.....	40
3.2.2.	Metais de Qualidade.....	41
3.2.2.1.	Ferro.....	41
3.2.2.2.	Manganês.....	44
3.2.2.3.	Níquel.....	45
3.2.2.4.	Sódio.....	47

3.2.2.5. Cobre.....	48
3.2.2.6. Cálcio	50
3.2.2.7. Magnésio.....	52
3.2.2.8. Zinco.....	53
3.3. Análise Multivariada	54
<i>Capítulo 4. Conclusões</i>	58
4.1. Conclusões.....	59
<i>Capítulo 5. Bibliografia</i>	60
5.1. Referências Bibliográficas	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Corte transversal de uma azeitona com as suas partes constituintes	- 5 -
Figura 2.	Amostra da cultivar Cobrançosa.....	- 8 -
Figura 3.	Distribuição dos Azeites DOP em Portugal..	- 12 -
Figura 4.	Concentração de Al ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitonas e azeites.....	36
Figura 5.	Concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.	37
Figura 6.	Concentração de As ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.	39
Figura 7.	Concentração de Cd ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.....	40
Figura 8.	Concentração de Fe ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.	43
Figura 9.	Concentração de Mn ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.....	45
Figura 10.	Concentração de Ni ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.	46
Figura 11.	Concentração de Na (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.	48
Figura 12.	Concentração de Cu ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.....	50
Figura 13.	Concentração de Ca (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.	51
Figura 14.	Concentração de Mg (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.....	52
Figura 15.	Concentração de Zn ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.	54
Figura 16.	Discriminação das amostras relativamente ao estado de maturação em função do conteúdo em metais.	55
Figura 17.	Discriminação das amostras relativamente à atividade antioxidante em função do conteúdo em metais.	56
Figura 18.	Discriminação das amostras relativamente ao rendimento de produção em função do conteúdo em metais.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química da azeitona (% em peso).....	- 6 -
Tabela 2.	Variedade de oliveiras autorizadas nas várias regiões agrárias em Portugal	- 7 -
Tabela 3.	Identificação das amostras de azeitona.....	- 23 -
Tabela 4.	Identificação das amostras de azeite.....	- 24 -
Tabela 5.	Massa das amostras de azeite	- 27 -
Tabela 6.	Massa das amostras de azeitona	- 28 -
Tabela 7.	Teor médio \pm desvio-padrão e respetiva de metais presentes em cada uma das amostras de azeitonas analisadas	- 33-
Tabela 8.	Teor médio \pm desvio-padrão e respetiva de metais presentes em cada uma das amostras de azeites analisadas	- 34 -

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO



1.1. ENQUADRAMENTO TEMÁTICO

A alimentação funciona como uma dupla face para o Homem, além de ser uma fonte nutricional que suporta a vida, funciona também como uma ponte que nos mantém unidos às nossas origens, costumes e tradições; estas, nos países Mediterrâneos, dos quais Portugal faz parte, incluem o consumo de azeite (Connor, 2005).

A oliveira é considerada das plantas mais antigas a ser cultivada, remontando a sua produção na Bacia Mediterrânica Oriental há cerca de 3000 a 4000 anos A.C. (Connor e Fereres, 2005). Na era dos descobrimentos, a cultura da oliveira estendeu-se a todos os continentes do globo.

Ao nível da produção mundial estima-se que o cultivo da oliveira ocupe uma área de 9,5 milhões de hectares, sendo que aproximadamente 90 % da produção é para a obtenção de azeite e o restante para a produção de azeitona de mesa. Os principais produtores de azeite na Europa são a Espanha, Grécia, Itália e Portugal, cuja produção representa 75 % da produção mundial (Janick and Paull, 2008). O cultivo da oliveira e a produção de azeite têm crescido muito nos últimos anos devido às propriedades com benefícios saudáveis atribuídas ao consumo de azeite, e à sua crescente valorização como produto *gourmet* na cozinha mediterrânica (Baiano *et al.*, 2010).

Nos países da bacia mediterrânica, o azeite tem, além da sua importância nutricional, um grande valor sociocultural e económico. A sua produção constitui, em várias regiões desfavorecidas, o principal suporte da atividade económica (Cunha, 2007).

O consumo significativo de azeite está relacionado com os benefícios para a saúde e as características organoléticas que advêm da sua composição (essencialmente ao nível de secoridóides como a oleuropeína), sendo estas as principais responsáveis pela qualidade do azeite (Covas *et al.*, 2009).

O sabor que confere aos alimentos, a sua boa tolerância gástrica e a estabilidade das suas propriedades nutricionais, quando submetido a temperaturas elevadas (até 200° C), permitem classificá-lo como gordura de excelente qualidade alimentar (Gunstone, 2002; Gouveia *et al.*, 2002).

O seu valor nutricional e funcional resulta das vantagens que representa para a saúde na prevenção de certas doenças, tais como, diminuição do risco de

doenças cardiovasculares, cancro, diabetes e até declínio cognitivo e aumento de qualidade de vida e longevidade (Huang, 2008).

A avaliação quantitativa de metais nos óleos comestíveis é de um elevado interesse devido, não só à potencial toxicidade dos diversos elementos, mas também à presença de algumas espécies metálicas que podem afetar a qualidade global (sabor e estabilidade) desses produtos (Souza *et al.*, 2005).

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A oliveira, *Olea europaea* L., pertence à família botânica *Oleaceae*, que abrange centenas de espécies, maioritariamente árvores e arbustos das regiões temperadas e paleotropicals (Bandino *et al.*, 2007).

É a única espécie desta família que produz um fruto comestível.

A oliveira é possivelmente uma das culturas com maior importância da bacia do Mediterrâneo. Foi possivelmente a primeira planta de porte arbóreo a ser cultivada, sendo assim considerada a árvore mais antiga cultivada pelo homem (Connor e Fereres, 2005).

Desde a Idade do Bronze que a riqueza de muitos povos do Mediterrâneo se centrou em torno do cultivo das oliveiras, as quais providenciavam o azeite e a azeitona. O azeite era usado na cozinha como unguento e para a iluminação. Dada a sua grande capacidade de conservação, este produto era facilmente comercializado. Os frutos também eram armazenados para consumo. O pão e o azeite eram, e ainda são, a base da alimentação de muitas comunidades de camponeses da Bacia do Mediterrâneo (Zohary e Hopf, 2000).

É uma árvore rústica, de grande longevidade e com folha persistente. A sua fácil propagação por via vegetativa permitiu que o seu cultivo se mantivesse ao longo dos séculos (Bandino *et al.*, 2007).

Morfologicamente, são árvores de porte médio, com uma copa redonda e bastante densa, mas as diversas intervenções humanas permitem uma maior entrada de luz, necessária ao seu desenvolvimento. O tipo de poda é inclusivamente fundamental na forma, não só da copa mas de toda a árvore, pelo que podemos afirmar que as oliveiras são árvores com elevada plasticidade morfológica (Connor, 2005).

O seu fruto, a azeitona, é valorizado comercialmente para a obtenção de azeite e para a produção de azeitona de mesa.

A popularidade recente, e ainda crescente, da oliveira como produção agrícola está relacionada com o aumento da procura dos seus produtos, nomeadamente o fruto, e o azeite que se extrai do mesmo, devido aos comprovados benefícios que têm para a saúde humana (Tuck e Hayball, 2002; Perona *et al.*, 2006).

1.2.1. AZEITONA

A principal utilização da azeitona é a produção de azeite e de azeitona de mesa. O azeite, produto resultante da maceração mecânica da azeitona, utiliza mais de 90% da produção mundial deste fruto, sendo os restantes 7 a 10% consumidos como azeitona de mesa. Esta é uma das mais antigas aplicações biotecnológicas no processamento de alimentos, que surgiram na região Mediterrânica e que ao longo dos tempos se tem vindo a expandir por outros países.

É um fruto que só pode ser consumido depois de processado devido ao facto de ser muito amargo em virtude de possuir compostos fenólicos que podem interagir com as proteínas salivares conferindo-lhes a sensação de adstringência (Spyropoulou *et al.*, 2001).

1.2.1.1. BOTÂNICA DA AZEITONA

Em termos botânicos a azeitona é uma drupa, e é constituída pelo exocarpo (cutícula), mesocarpo (polpa) e pelo endocarpo (caroço), onde está a amêndoa e se encontra o embrião e as reservas alimentares do fruto (Figura 1).

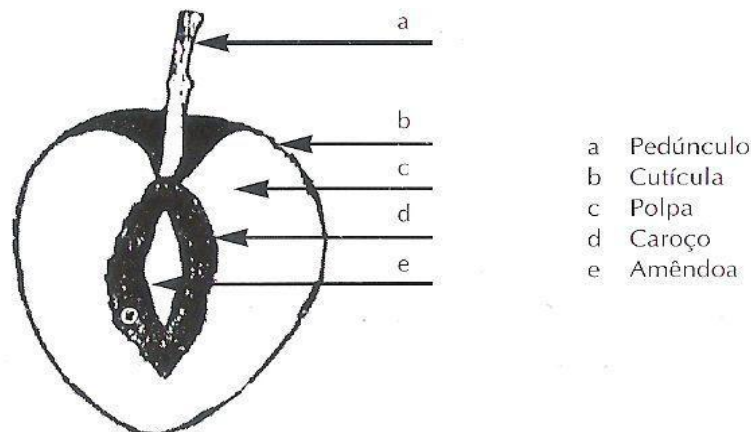


Figura 1. Corte transversal de uma azeitona com as suas partes constituintes
(Fonte: Luchetti, 2002)

A azeitona é um fruto pequeno de forma elipsoidal a globular, que normalmente mede 1-4 cm de comprimento e 0,6-2 cm de diâmetro.

Quando o fruto está completamente desenvolvido, a polpa representa 60-90 %, o caroço 10-40 % e a semente 1-2 % do peso total do fruto, dependendo do fim a que se destina (azeite ou azeitona de mesa), da variedade, estado de desenvolvimento e maturação, condições de cultivo e tipo de solo. A composição da polpa da azeitona varia entre 50-60 % de água e 20-30 % de gordura (Barranco *et al.* 1999; Garcia, 2005).

1.2.1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A azeitona é constituída por diversos componentes, nomeadamente água, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, pigmentos, vitaminas, minerais, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Tabela 1) (Hermoso *et al.*, 2004).

A água e os lípidos são os componentes mais importantes, representando cerca de 50-60% e 12-32% respetivamente, consoante se considere o fruto verde ou maduro.

Tabela 1. Composição química da azeitona (% em peso).

(Fonte: Adaptado de Mella, 2007)

	Polpa	Caroço	Epiderme
Água	50-60	9,3	30
Azeite	15-30	0,7	27,3
Açúcares	3-7,5	41	26,6
Celulose	3-5	38	1,9
Matéria Nitrogenada	2-5	3,4	10,2
Cinzas	1-2	4,1	1,5
Polifenóis	2-2,5	0,1	1-1,5
Indeterminados		3,4	2,4

1.2.1.3. CARACTERIZAÇÃO DA CULTIVAR COBRANÇOSA

A cultivar predominante em Portugal é a Galega Vulgar, que produz um azeite com características peculiares. Contudo, esta variedade é pouco produtiva, com baixo rendimento em azeite e muito sensível às pragas e doenças da oliveira (Bartolini *et al.*, 2005)

Atualmente estão a plantar-se outras cultivares, mais produtivas e com maior rendimento em azeite, como são os casos da Cobrançosa, Arbequina e Picual (Cooperativa Agrícola dos Olivicultores do Fundão, 2010).

A Cobrançosa é uma cultivar portuguesa vocacionada para a produção de azeite. Atualmente é uma das cultivares cujo cultivo está autorizado em todas as regiões agrárias (Tabela 2), com maior incidência na região de Trás-os-Montes, para a produção de azeites DOP (MADRP, 2007).

Tabela 2. Variedade de oliveiras autorizadas nas várias regiões agrárias em Portugal

(Fonte: Adaptado de Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e Pescas, 2007)

Região	Variedades Autorizadas
Algarve	Maçanilha, Galega, Cobrançosa
Alentejo	Galega, Cordovil, Verdeal, Cobrançosa , Maçanilha, Carrasquenha, Bical de Évora, Redondil, Conserva de Elvas, Azeiteira
Ribatejo	Galega, Cobrançosa , Lentisca
Beiras	Galega, Cordovil, Bical, Cobrançosa , Carrasquinha, Cornicabra
Trás-os-Montes	Cobrançosa , Verdeal, Madural, Negrinha, Santulhana

Possui porte pequeno ou médio, arborescência mediana e ramificação de comprimento médio, ramos acinzentados esverdeados e quebradiços, folhas pequenas, compridas e estreitas, com rebordo encurvado ou planas de consistência média (figura 2). Tem inflorescências de comprimento médio ou curto com um número de flores por inflorescência mediano, sem flores supranumerárias.

O fruto é de tamanho médio, elipsoidal, de diâmetro máximo na parte mediana, forma apical pontiaguda ou arredondada, cavidade peduncular pequena e medianamente profunda.

O pericarpo é avermelhado na viragem, vermelho escuro ou negro na maturação. O mesocarpo é de consistência rija e aderente ao endocarpo que, por sua vez, é grande, alongado ou elipsoidal, de forma apical pontiaguda e superfície rugosa (figura 2) (Cordeiro *et al.*, 2010).



Figura 2. Amostra da cultivar Cobrançosa

(Fonte: Adaptado de Vida Rural nº 1746 - Abril 2009)

Tem uma boa capacidade de propagação por estaca herbácea e apresenta baixa resistência do fruto ao desprendimento. Tem bom rendimento em azeite de mediana riqueza em ácido linoleico (Cordeiro *et al.*, 2010).

Apresenta grande tolerância ao frio, à clorose do ferro e ao patogénico *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi* responsável pela tuberculose na oliveira (Bartolini *et al.*, 2005).

1.2.2. AZEITE

O azeite consiste no óleo obtido unicamente a partir do fruto da oliveira (*Olea Europea* L.), com exclusão dos óleos obtidos através do uso de solventes ou processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza (COI, 2008).

O azeite virgem conserva o sabor, aroma e todas as propriedades do fruto do qual tem origem, pelo que, possui características organolépticas particulares, que permitem distingui-lo dos restantes óleos e gorduras (Gutierrez, 2009).

É o único de todos os óleos vegetais que pode ser consumido no estado virgem, sem qualquer processo de refinação, conservando assim todas as suas vitaminas e outros constituintes naturais importantes (Aparício *et al.*, 2000).

1.2.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O azeite é um produto em que é exigida a máxima qualidade, com isto, torna-se necessário que se obtenha um conhecimento de todos os constituintes. O detalhado conhecimento da composição química do azeite permite fazer a caracterização das diferentes cultivares de azeitona, realçando a importância da

definição varietal na distinção dos diferentes azeites. A sua composição diferenciada pode ser utilizada no estabelecimento de parâmetros que podem ser utilizados na autenticidade dos mesmos (Kapellakis, 2008).

Do ponto de vista químico, os componentes do azeite podem dividir-se em duas frações: uma saponificável (fração que permite a formação de sabões, sais de sódio e/ou potássio, por hidrólise em meio alcalino) e outra insaponificável (Cunha, 2007).

A primeira fração constitui cerca de 97 a 99% do peso total do azeite, constituída maioritariamente por triacilgliceróis, uma pequena fração de di e mono gliceróis e de ácidos gordos livres, responsáveis pela acidez do azeite (Cunha, 2007 e Luchetti, 2002).

A composição em ácidos gordos do azeite pode variar de acordo com a variedade da azeitona, condições climáticas e local de produção (Luchetti, 2002).

A fração insaponificável integra um conjunto muito variado de substâncias: ceras, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, pigmentos, fosfolípidos, compostos fenólicos, fitosteróis e tocoferóis.

Embora constituam a fração minoritária do azeite, a presença destas substâncias reveste-se de elevada importância, tanto do ponto de vista funcional como da estabilidade e da qualidade organoléptica do produto (Cunha, 2007).

Dada a sua elevada especificidade, os componentes minoritários são muitas vezes usados como critério de qualidade e de autenticidade (Garcia, 2005).

1.2.2.2. IMPORTÂNCIA NA ALIMENTAÇÃO

Ao longo dos últimos anos tem-se vindo a salientar o benefício da Dieta Mediterrânica; isto porque, apesar do elevado consumo de gordura, os resultados de vários trabalhos científicos evidenciam que este padrão alimentar está associado, entre outros, à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, cancro, diabetes e até declínio cognitivo e aumento de qualidade de vida e longevidade (Huang, 2008).

A dieta tradicional mediterrânea é caracterizada pela abundância em fruta, vegetais, cereais e legumes, em que, o azeite é a principal fonte de gordura (Pancorbo, 2006).

Esta dieta é rica em ácidos gordos monoinsaturados e baixa em ácidos gordos saturados, contribuindo beneficentemente para a saúde do ser humano (Huang, 2008).

O ácido oleico, tal como os ácidos gordos polinsaturados, diminui os níveis sanguíneos de colesterol LDL, fator de risco na ocorrência das doenças cardiovasculares, com a vantagem de não baixar os níveis de colesterol HDL (Granados, 2000; Duarte, 2003).

A riqueza do azeite em antioxidantes, principalmente vitamina E e compostos fenólicos, contribui para a conservação dos tecidos, retardando o envelhecimento (Pérez-Martinez, 2010).

No que se refere ao aparelho digestivo, o azeite é a gordura melhor tolerada pelo estômago. É tonificante, mostra efeitos benéficos nas gastrites e na úlcera gastroduodenal (Perez-Jimenez *et al.*, 2005).

O azeite também ajuda a aliviar a prisão de ventre devido à falta de tonos muscular, tendo um efeito laxante que conduz à contração da vesícula biliar e à ativação dos movimentos peristálticos do intestino delgado (Huang, 2008).

Aumenta o poder de desintoxicação do fígado e contribui para a melhoria da fase posterior da digestão, ao proporcionar uma ação mais eficaz da bÍlis na emulsão das gorduras (Covas, 2007)

Relativamente à infância, sabe-se que os ácidos gordos polinsaturados são essenciais do ponto de vista metabólico para os bebés e continuam a sê-lo durante o período de crescimento das crianças.

O azeite proporciona uma relação ácido linoleico / ácido linolénico semelhante à da gordura do leite materno. Além disso, o ácido oleico tem uma ação positiva no crescimento, na mineralização e no desenvolvimento dos ossos (Aparício *et al.*, 2000).

O efeito positivo do azeite, especificamente dos seus oleatos e ácidos gordos essenciais, na mineralização dos ossos é eficaz também na idade adulta, limitando a perda de cálcio devido ao envelhecimento (Gouveia *et al.*, 2002).

O azeite é a gordura que apresenta as melhores características de digestibilidade (com o coeficiente de digestibilidade mais alto de todas as gorduras) e de poder de absorção (com um índice de absorção de cerca de 98%), pelo que se torna indicado o seu consumo pelos idosos.

O sabor característico dos azeites e a sua maior viscosidade revelam-se vantajosas nos regimes hipo-lípidicos ou hipo-calóricos, por problemas de obesidade, diabetes ou certos tipos de cancro, dado que, mesmo em pequenas quantidades, o azeite torna os alimentos mais agradáveis ao paladar, quer em cru, quer aquecido (Gunstone, 2002; Gouveia *et al.*, 2002).

1.2.2.3. AZEITE EM PORTUGAL

Sendo dos principais produtores mundiais de azeite, Portugal tem, na olivicultura, um fator de importância significativa para o país, não só do ponto de vista económico, mas também do ponto de vista social nas regiões produtoras, devido à sua ligação às condições naturais das zonas, sendo os olivais mais valias patrimoniais, paisagísticas e culturais (MADRP, 2007).

Portugal ocupa a quarta posição na União Europeia em termos de produção de azeite, a seguir a Espanha, Itália e Grécia (Faostat, 2007). Embora o olival esteja presente em todas as regiões de Portugal, em algumas representa a principal cultura agrícola e a maior fonte de rendimento económico. É o caso do Alentejo, que ocupa a primeira posição na produção de azeitonas destinadas a azeite, seguido da região de Trás-os-Montes (INE, 2007).

A cultivar mais utilizada no país é a “Galega” (atualmente representando cerca de 60% de todas as oliveiras no país), existindo ainda outras cultivares que ocupam áreas significativas como a “Cobrançosa” na região de Trás-os-Montes, correspondendo a 20% da área de olival (MADRP, 2007).

Cada região produz um azeite diferente, já que as cultivares de oliveira utilizadas nas diversas zonas olivícolas originam um produto singular em termos das suas características. As características do azeite são influenciadas por condições climáticas, práticas culturais, maturação do fruto e modo de transformação da azeitona (Pasqualone *et al.*, 2007).

1.2.2.4. AZEITE DOP

As iniciais de “Denominação de Origem Protegida” (DOP), designam um produto agrícola ou alimentar produzido e transformado numa região específica, cuja

qualidade se deve principalmente aos fatores humanos e naturais do meio geográfico delimitado (Pasqualone *et al.*, 2007).

Trata-se de um produto produzido de acordo com regras pré-estabelecidas, as quais incluem nomeadamente variedades de azeitonas, condições de apanha e de transporte, extração do azeite, entre outras, de forma a assegurar a sua especificidade e elevada qualidade, com características químicas e sensoriais únicas (Custodio, 2009).

Este azeite caracteriza-se por ser equilibrado, com cheiro e sabor a fruto fresco, por vezes amendoado, e com uma sensação notável de doce, verde, amargo e picante (Reg.1107/96).

Os produtos de denominação de origem protegida possuem um valor económico superior comparativamente com os que não têm essa denominação (Doveri e Baldoni, 2007).

A produção de azeite DOP tem vindo a aumentar nas últimas décadas em Portugal, representando atualmente cerca de 4% da produção nacional de azeite virgem (INE, 2007).

Em Portugal existem seis Denominações de Origem Protegida para o mercado do azeite - Azeite de Trás-os-Montes, Azeites da Beira Interior, Azeites do Ribatejo, Azeites do Norte Alentejo, Azeite de Moura e Azeites do Alentejo Interior (Figura 3) (MADRP 2007).



Figura 3. Distribuição dos Azeites DOP em Portugal.

(Fonte: AFG Alimentar, 2013)

1.2.3. PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA DAS AZEITONAS E AZEITE

1.2.3.1. METAIS

Os metais e metalóides formam um importante grupo de substâncias tóxicas que apresentam muitas dificuldades quanto à sua análise química sistemática. Nos países desenvolvidos o maior número de casos conhecidos de intoxicação por estes agentes deve-se a intoxicação crónica, resultante da exposição ambiental ou ocupacional (Moffat *et al.*, 2004).

Os metais são provavelmente o grupo de substâncias tóxicas mais antigo conhecido do homem. Supõe-se que o chumbo começou a ser utilizado perto do ano de 2000 a.C. Hipócrates, em 370 a.C., descreveu a primeira cólica abdominal de um homem que trabalhava na extração de minério (Sarikurkcu, 2011).

O arsénio (As) e mercúrio (Hg) são citados por Theophrastus de Erebus em 310 a 287 a.C. e por Plínio, O Velho, no séc. I a.C. (Casarett e Doull's, 1996; De Guevara e Pueyo, 1995).

Cerca de 80 dos 105 elementos da tabela periódica são considerados metais, mas menos de 30 foram identificados como substâncias tóxicas para o homem (Casarett e Doull's, 1996).

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até ao ser humano, mas são necessários em baixas concentrações e podem danificar os sistemas biológicos, se estiverem em concentrações elevadas.

A manifestação dos efeitos tóxicos está associada à dose e pode distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos e as membranas celulares (Llorent-Martínez *et al.*, 2011a).

Alguns metais sofrem o processo de bioacumulação no organismo dos seres vivos, isto é, são absorvidos e retidos, e o organismo não consegue desenvolver mecanismos de eliminação destas substâncias. Pode ser de uma forma direta através do ambiente que os envolve e/ou indiretamente a partir da alimentação (Geraldés, 2004).

A presença de metais no azeite é causada por diversos fatores: tecnologia, genótipo da oliveira, fertilizantes e pesticidas introduzidos durante o processo de

produção, contaminação do equipamento durante o processamento e pela exposição ambiental (Jamali *et al.*, 2008).

O último é o resultado da deposição natural das plantas e bioacumulação que está diretamente associado às fontes naturais de metais no solo e à poluição ambiental. A concentração destes metais tem uma elevada importância para a avaliação da sua qualidade, nomeadamente no que diz respeito à frescura, capacidade de armazenamento e toxicidade (Matos & Campos, 2006).

Os metais podem ser classificados como essenciais (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni), provavelmente essenciais (Vn, Co) e potencialmente tóxicos (As, Cd, Pb, Al). No entanto, os metais essenciais também podem produzir efeitos tóxicos quando a ingestão do metal é excessivamente elevada (Gopalani *et al.*, 2007). Além disso, alguns metais (por exemplo, Cu, Zn, Fe, Mn, Ni) podem acelerar os processos de oxidação de óleos comestíveis, uma vez que têm um efeito negativo sobre a sua qualidade sensorial (Benedet & Shibamoto, 2008).

1.2.3.2. BENÉFICOS VERSUS PREJUDICIAIS

Os metais pesados são causadores de muitos efeitos negativos para a saúde humana, principalmente através da contaminação ambiental, onde a remediação da poluição por metais se torna difícil devido à sua elevada persistência e à sua baixa degradabilidade no ambiente (Yuan *et al.*, 2004).

Os metais são elementos, que ocorrem na natureza em diferentes formas, caracterizados por apresentarem uma boa condutividade elétrica e térmica, geralmente com um alto ponto de fusão e de ebulição e uma elevada dureza.

Os metais pesados são considerados também uma das principais fontes de poluição no ambiente. A atividade humana tem levado a um aumento dos seus níveis no meio ambiente. Devido à poluição industrial e atmosférica, os metais pesados acumulam-se no solo, influenciando os ecossistemas mais próximos. Uma vez presentes no corpo humano, podem depositar-se nos tecidos, causando doenças graves (Jamali *et al.*, 2008).

O problema dos metais pesados no meio ambiente tem a ver com a sua forma e quantidade. Dependendo das condições físicas e químicas do meio, os metais podem alterar o seu estado de oxidação, formar complexos ou mesmo precipitar.

Dos diferentes metais pesados difundidos no ambiente, o cádmio, o chumbo, o arsénio e o alumínio são os apontados como os de maior risco para a segurança alimentar (Lopes 2009; Veiga *et al.*, 2009).

O chumbo e o cobre, estão potencialmente presentes no azeite devido à contaminação ambiental. Por sua vez, o ferro pode provir de fontes naturais, ou ser introduzido ao longo da linha de produção.

Normalmente os elementos mais vulgarmente associados a intoxicações são o arsénio, antimónio, chumbo, lítio, mercúrio e o tálio (Moffat *et al.*, 2004).

1.2.3.3. METAIS RELACIONADOS COM A SEGURANÇA

1.2.3.3.1. ALUMÍNIO

O alumínio é o metal pesado mais comum da crosta terrestre, devido à sua natureza reativa, não existindo como elemento livre, apenas combinado com o oxigénio, silício, flúor, entre outros. Nos dias de hoje, com o aumento da absorção deste metal pesado pelas plantas e animais, e como consequência ao longo da cadeia alimentar, tem sido motivo de preocupação para ambientalistas e autoridades de saúde (Reilly, 2002).

É um elemento importante para a formação da matriz óssea e mineralização, sendo responsável pelo metabolismo do cálcio (Santana, 2008).

Interage com outros elementos como cálcio, flúor, ferro, magnésio, fósforo e estrôncio, e quando ingerido em excesso pode reduzir as suas absorções.

Este metal pesado tem sido associado a diversas doenças cerebrais. O alumínio causa desde efeitos discretos como a diminuição da atenção e da concentração, sendo seguido de sintomas neurológicos resultando num efeito mais severo da capacidade psicomotora e cognitiva, podendo ser responsável por desencadear doenças como demência, Alzheimer e Parkinson (Reilly, 2002). Em concentrações elevadas provoca intoxicações agudas a pessoas com insuficiência renal que não conseguem excretar este elemento (Miranda, 2008).

A presença deste em alimentos deve-se, não só ao facto de ser um mineral presente naturalmente no meio ambiente, como também por entrar em contato direto com alimentos através de utensílios e embalagens (Reilly, 2002).

1.2.3.3.2. ARSÉNIO

O arsénio é difícil de caracterizar como elemento único, a sua química é muito complexa, existindo inúmeros compostos diferentes de arsénio. Está presente em mais de 200 espécies minerais sendo a mais comum a arsenopirite (Casarett e Doull's, 1996; INCHEM, 2001).

Em conjunto com os metais pesados Pb, Cd e Hg, é um dos elementos cuja presença está relacionada com um elevado número de intoxicações ao longo da história da humanidade. As formas químicas inorgânicas de As podem causar intoxicação aguda ou crónica, encontrando-se associados a vários tipos de cancro, particularmente ao cancro de pele (por ingestão) (Catarino *et al.*, 2007).

Segundo alguns autores, a maior fonte de exposição humana, nos nossos dias, ao arsénio é a produção de pesticidas, herbicidas e outros produtos agrícolas (Herce-Pagliai *et al.*, 2002).

1.2.3.3.3. CÁDMIO

O cádmio que aparece naturalmente nas rochas e solo é pouco abundante no seu estado puro (Veiga *et al.*, 2009). Este metal pesado encontra-se também nos sistemas aquáticos onde aparece em concentrações muito variáveis dependendo da área geográfica (Lopes, 2009).

Na maioria dos países, a fonte mais relevante de exposição ao cádmio é a alimentação. Os níveis de ingestão deste metal vão depender das condições em que os alimentos são produzidos, e dos diferentes hábitos alimentares que as populações têm, pois este elemento químico encontra-se presente na maior parte dos alimentos, em concentrações muito distintas (Lopes, 2009).

É um metal extremamente tóxico, bioacumulativo e cancerígeno, suscetível de ser introduzido no organismo humano por via respiratória, oral e cutânea (Catarino *et al.*, 2007).

Não é um metal essencial e interage com o metabolismo do cálcio, zinco e do ferro. Os efeitos toxicológicos resultantes da exposição oral crónica e mais crítica ao cádmio verificam-se ao nível dos rins. O cádmio pode também causar danos ao nível dos ossos, levando à conhecida doença de Itai-Itai, diagnosticada pela primeira vez no Japão nos anos 50 (Veiga *et al.*, 2009).

1.2.3.3.4. CHUMBO

O chumbo é também um metal pesado que se encontra disseminado em toda a natureza podendo estar sob a forma de chumbo orgânico e inorgânico, sendo ambas as formas consideradas tóxicas. O chumbo não apresenta nenhuma função específica no organismo humano, no entanto sabe-se que induz um diverso conjunto de disfunções de ordem fisiológica, comportamental e bioquímica (Lopes, 2009).

Os compostos de chumbo são absorvidos por via respiratória e cutânea. Os efeitos adversos provocados por este metal são bastante mais graves do que os de outros contaminantes ambientais.

Os efeitos patológicos do metal fazem-se sentir ao nível do sistema sanguíneo, por inibição da síntese de hemoglobina, ao nível do sistema nervoso provocando encefalopatia crónica, problemas neurológicos e psicomotores, ao nível do sistema renal, nefropatia e alteração progressiva da função renal, e ao nível do sistema cardiovascular (Catarino *et al.*, 2007).

É muito tóxico para a maioria das plantas e é um veneno cumulativo nos mamíferos. Afeta praticamente todos os órgãos (principalmente o fígado e os rins) e sistemas (nervoso central, cardiovascular, reprodutor masculino e feminino) do corpo humano (Santana, 2008).

1.2.3.4. METAIS RELACIONADOS COM A QUALIDADE

1.2.3.4.1. CÁLCIO

É o metal mais abundante no corpo humano e o quinto mais abundante na crosta terrestre (1,6% em massa). É essencial para os seres vivos, sendo o componente maioritário dos ossos e dos dentes. Desempenha funções vitais na atividade cardíaca, na coagulação sanguínea, na contração muscular e na transmissão nervosa (Charana, 2008).

O excesso de Ca no organismo pode ocasionar diversos problemas e doenças, tais como as conhecidas “pedras” nos rins, provocar a redução de outros minerais, como o magnésio, causar anorexia, dificuldade de memorização, depressão, irritabilidade e fraqueza muscular (Silva, 2006).

1.2.3.4.2. COBALTO

Apesar de possuir inúmeras vantagens, o cobalto é uma substância que apresenta um grande nível de toxicidade.

A via respiratória e o trato intestinal são os sistemas que melhor conseguem absorver o cobalto no organismo, no entanto, todos os tecidos do corpo são capazes de captá-lo.

A toxicidade deste elemento revela-se através de manifestações alérgicas (Catarino *et al.*, 2007).

1.2.3.4.3. COBRE

O cobre é um micronutriente essencial que participa em várias funções fisiológicas nos organismos, integrando a estrutura de algumas proteínas e enzimas que participam na defesa do organismo contra a ação de radicais livres e na respiração celular, além de atuar como co fator enzimático (Catarino *et al.*, 2007).

É um elemento altamente tóxico para invertebrados, muito tóxico para as plantas, e moderadamente tóxico para os mamíferos. A toxicidade crônica do cobre ocorre principalmente em portadores de insuficiência renal que façam hemodiálise. Manifesta-se por disfunção e lesão hepatocelular (Santana, 2008).

1.2.3.4.4. FERRO

O ferro exerce a função como elemento estrutural do grupo heme na hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio e do dióxido de carbono no sangue (Santana, 2008).

A deficiência de ferro é considerada a carência nutricional mais prevalente em todo o mundo, afetando principalmente lactentes, pré-escolares, adolescentes e gestantes.

A anemia, diminuição anormal na concentração de hemoglobina no sangue, é considerada a principal consequência da deficiência de ferro. Numa fase mais avançada, está associada a sintomas clínicos de fraqueza, diminuição da capacidade respiratória e tontura. Mesmo na ausência de anemia, a deficiência de ferro pode acarretar distúrbios neurocognitivos (Charana, 2008).

O seu excesso é relativamente tóxico, tendo efeitos mutagénicos, nefrotóxicos e carcinogénicos. Concentrações elevadas de ferro no organismo ocasionam a hemocromatose (doentes que se caracterizam por pigmentação amarelada na pele), lesão pancreática com diabetes, cirrose hepática e incidência elevada de carcinoma hepático (Santana, 2008).

1.2.3.4.5. MAGNÉSIO

O papel fisiológico do magnésio é importante pois este intervém na regulação da atividade de inúmeras reações enzimáticas. Intervém, igualmente, na duplicação dos ácidos nucleicos, na excitabilidade neural e na transmissão de influxo nervoso agindo sobre as trocas iónicas da membrana celular. A nível do sistema cardiovascular é um opositor do cálcio.

Quando em excesso no organismo, o magnésio pode causar rubor facial, hipotensão, fraqueza muscular, náuseas, insuficiência respiratória, boca seca e sede crónica (Edlund *et al.*, 2002).

1.2.3.4.6. MANGANÊS

O manganês é um metal essencial para os seres vivos, desempenhando várias funções biológicas importantes. Está presente nos fluidos celulares, sendo essencial para o bom funcionamento de várias enzimas (Charana, 2008). Está associado à formação do tecido conjuntivo e ósseo, crescimento e reprodução e metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. As exposições mais significativas ocorrem através dos fumos e poeiras de manganês. O trato respiratório é a principal via de penetração e absorção deste metal.

É um metal moderadamente tóxico e em excesso pode acumular-se no fígado e sistema central, podendo causar posteriormente sintomas característicos da Doença de Parkinson (Santana, 2008).

1.2.3.4.7. NÍQUEL

Pode funcionar como um co fator ou como componente estrutural de enzimas. É essencial em baixas concentrações mas tóxico em elevadas concentrações. Este metal pesado surge associado a dermatites, podendo ter um

efeito cancerígeno (por ingestão), embora os estudos epidemiológicos em humanos sejam ainda escassos (Catarino *et al.*, 2007).

1.2.3.4.8. SÓDIO

Quase todos os produtos industrializados possuem quantidades consideráveis de sódio, dado que este é utilizado para realçar o sabor dos alimentos e também para os conservar.

O excesso de sódio tem colaborado e muito para aumentar os níveis de pressão arterial, não só em adultos, mas também em crianças e adolescentes. Além do seu papel na hipertensão, a ingestão excessiva de sal está associada a uma maior excreção urinária de cálcio (Mahan, 2005).

Doses excessivas de sódio provocam vômitos, doenças cardíacas, problemas gastrointestinais e complicações em doentes renais (Charana, 2008).

Estudos relacionam a ingestão de sal e a densidade mineral óssea, sugerindo que a ingestão elevada de sal pode ser um fator de risco para a osteoporose (Mahan, 2005).

1.2.3.4.9. ZINCO

O zinco é um elemento metálico de extrema importância para as funções biológicas dos seres vivos desde que esteja dentro das concentrações recomendadas diariamente. Participa em reações que envolvem a síntese ou a degradação de metabolitos, tais como: hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Santana, 2008; Silva, 2006).

Altas concentrações deste metal podem tornar-se perigosas para a saúde dos seres vivos.

O excesso de zinco no organismo também pode provocar distúrbios no sistema nervoso central (Santana, 2008).

1.3. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido na sequência de outro trabalho já publicado, no qual foram estudados os parâmetros químicos e bioquímicos de seis clones de azeitona (em dois estados de maturação) e respetivos azeites (nos mesmos estados de maturação).

Caracterizaram-se esses clones relativamente ao rendimento de produção e respetiva atividade antioxidante, pelo que neste trabalho se pretendeu efetuar a determinação do teor em metais relacionados com a qualidade e a segurança destes produtos, e estabelecer alguma relação entre todos os parâmetros.

De igual forma, pretendeu-se também verificar qual a contribuição de cada um dos metais para os parâmetros anteriormente referidos, e verificar se o facto de estes serem geneticamente diferentes também se traduz em diferente conteúdo em metais, uma vez que em termos de características bioquímicas se verificam diferenças.

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL



2.1. AMOSTRAGEM

Os seis clones estudados foram escolhidos, tendo em conta um estudo realizado durante dois anos consecutivos, no qual se utilizaram 24 clones da cultivar Cobrançosa, provenientes de um campo clonal situado em Mirandela, Portugal.

As azeitonas foram colhidas em dois estados de maturação: verde e maduro. As amostras relativas ao estado verde foram colhidas em Outubro (14-10-2012), e as amostras maduras em Novembro (8-11-2012).

Os clones foram catalogados segundo o seu rendimento de produção pelos produtores e caracterizados quanto à sua composição fenólica e atividade antioxidante. As amostras de azeite foram preparadas na Unidade Nacional de Investigação Agrária (INIAV.I.P), Elvas, Portugal. Foram usados 3Kg de azeitonas frescas, para a produção de azeite, usando um sistema Abencor.

Nas tabelas 3 e 4, encontra-se a identificação de todas as amostras de azeitona e de azeite, o seu estado de maturação, bem como a sua atividade antioxidante e o seu rendimento de produção (Sousa *et al.*, 2014).

Tabela 3. Identificação das amostras de azeitona

Estado de Maturação	Amostras	Clone	Atividade Antioxidante	Rendimento de Produção
Verde	A	1163	Alta	Alto
	B	0172	Alta	Baixo
	C	1191	Alta	Alto
	D	2252	Baixa	Baixo
	E	2271	Baixa	Alto
	F	1023	Alta	Baixo
Maduro	G	1163	Alta	Alto
	H	0172	Alta	Baixo
	I	1191	Alta	Alto
	J	2252	Baixa	Baixo
	L	2271	Baixa	Alto
	M	1023	Alta	Baixo

Tabela 4. Identificação das amostras de azeite

Estado de Maturação	Amostras	Clone	Atividade Antioxidante	Rendimento de Produção
Verde	1	1163	Alta	Alto
	2	0172	Alta	Baixo
	3	1191	Alta	Alto
	4	2252	Baixa	Baixo
	5	2271	Baixa	Alto
	6	1023	Alta	Baixo
Maduro	7	1163	Alta	Alto
	8	0172	Alta	Baixo
	9	1191	Alta	Alto
	10	2252	Baixa	Baixo
	11	2271	Baixa	Alto
	12	1023	Alta	Baixo

2.2. DETERMINAÇÃO DE METAIS

Neste trabalho foi feita a pesquisa de vários metais, nas diferentes amostras de azeites e azeitonas: cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg), sódio (Na), cobalto (Co), cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), níquel (Ni), chumbo (Pb), cádmio (Cd), alumínio total (Al) e arsénio (As).

Os métodos usados para a sua determinação foram diferentes. Assim:

- O sódio foi analisado pelo método de Espectrofotometria de Emissão Atômica, utilizando o equipamento Thermo Scientific ICE 3000;
- O cálcio e magnésio, foram analisados pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama, utilizando o equipamento Thermo Scientific ICE 3000;
- O alumínio, arsénio, cádmio, cobalto, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo e zinco, foram analisados pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica em Câmara de Grafite, utilizando o equipamento UNICAM 939 AA Spectrometer with GF 90 Furnace.

2.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

A espectrofotometria de absorção atômica (EAA), foi introduzida em 1995 por Walsh na Austrália e por Alkemade e Milatz na Holanda e é nos dias de hoje um método muito usado devido à sua simplicidade e custo relativamente baixo (Mustra, 2009).

As diferentes técnicas associadas à EAA, como a chama, a câmara de grafite, a geração de hidretos e o vapor frio, permitem determinar quantitativamente, com sensibilidade suficiente, mais de 60 elementos (elementos que possuam linhas de absorção a um comprimento de onda facilmente acessível (>190 nm), isto é, todos os elementos metálicos da tabela periódica).

A sensibilidade destes métodos atinge tipicamente gamas de concentração na ordem dos ppm (partes por milhão) até ppb (partes por bilião). Outras vantagens são a rapidez, a elevada seletividade e custos relativamente moderados.

Trata-se da técnica mais vulgarmente usada na determinação de metais e metaloides. A sua aplicação é apropriada a determinações de rotina mesmo com operadores relativamente pouco treinados (Moffat *et al.*, 2004).

2.2.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA POR CHAMA

A absorção atômica por chama é um meio sensível de determinação de cerca de 70 elementos. A maior limitação prende-se com o facto de ser necessário uma lâmpada diferente para cada elemento pois apenas é analisado um analito de cada vez.

Permite detetar teores numa gama de concentrações na ordem dos mg/L. No entanto, quando queremos analisar teores vestigiais, na ordem dos $\mu\text{g/L}$ é necessária uma técnica mais sensível. As análises quantitativas são baseadas em calibrações com padrões externos.

Em condições normais, o erro relativo associado a uma análise por absorção atômica por chama é na ordem de 1 a 2% (Gonçalves, 2001).

2.2.1.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA EM CÂMARA DE GRAFITE

Neste método a amostra vai ser aplicada a partir de uma micropipeta através do orifício de injeção no centro do tubo de grafite. A atomização decorre rapidamente (1-2 seg.) devido ao aquecimento eletrotérmico do tubo de grafite. O feixe luminoso do comprimento de onda adequado passa ao longo do eixo do tubo de grafite. Os átomos do elemento a determinar são confinados ao tubo de grafite por um intervalo de tempo relativamente longo, o que torna a técnica muito sensível. Esta técnica deteta valores vestigiais, na ordem dos $\mu\text{g/L}$ (Ribeiro, 2005).

2.2.3. ESPECTROFOTOMETRIA DE EMISSÃO ATÓMICA

Este método determina numa maneira qualitativa e quantitativa, a concentração do analito através da medição das emissões óticas de átomos excitados.

As amostras são primeiro convertidas em gás e, em seguida, excitadas pelo fogo, descargas elétricas, laser ou fonte de plasma, em função de critérios operacionais e de medição pretendidos.

Quando os átomos excitados do gás retornam a um estado relaxado, a energia é libertada na forma de luz que pode ser separada em linhas espectrais características por um monocromador.

Para a determinação dos elementos contidos na amostra, é medida a presença e intensidade dessa luz dispersa. Esta capacidade de medir simultaneamente vários elementos é uma das principais vantagens da espectrofotometria de emissão atômica em relação à espectrofotometria de absorção atômica (Brian M. Tissue, 1996).

2.2.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram pesadas cerca de 0,5g de cada amostra em triplicado, para tubos de ensaio. Seguidamente foram adicionados a cada amostra 5ml de HNO₃ e 2,5ml de H₂O₂. Esta solução foi deixada a repousar durante 24h à temperatura ambiente com um berlinde a tapar o orifício do tubo, para que a amostra não evaporasse.

Ligou-se o digestor e só quando este atingiu uma temperatura de 80°C, foram colocados os tubos, onde permaneceram durante uma hora. Posteriormente a temperatura foi subida para 100°C (temperatura em que começam a aparecer os fumos castanhos de NO), 120°C, 130°C, 145°C onde as amostras permaneceram durante 2 horas em cada um destas temperaturas.

Em seguida, elevou-se a temperatura para 155°C onde permaneceram até clarificar, significando que já não havia matéria orgânica, podendo-se retirar os berlindes para que as amostras pudessem secar. Por fim, foram adicionados 10ml da solução matriz de HNO₃ (1,5ml para 1000ml) e homogeneizou-se.

Para algumas das soluções de amostras, foi necessário proceder a diluições, para poderem ser feitas as leituras dos respetivos metais. Todas as leituras foram efetuadas em triplicado e para a análise de cada um dos metais foi necessário traçar a respetiva reta de calibração com o metal correspondente.

Nas tabelas 5 e 6 encontram-se as massas das amostras obtidas.

Tabela 5. Massa das amostras de azeitona

Pesagem de Réplicas em g				
Azeitona	Amostras	1	2	3
	A	0,561	0,552	0,549
	B	0,493	0,504	0,518
	C	0,563	0,550	0,541
	D	0,501	0,527	0,520
	E	0,522	0,509	0,492
	F	0,491	0,501	0,526
	G	0,502	0,546	0,503
	H	0,511	0,510	0,523
	I	0,490	0,501	0,490
	J	0,508	0,507	0,492
	L	0,493	0,521	0,541
	M	0,493	0,492	0,521

Tabela 6. Massa das amostras de azeite

		Pesagem de Réplicas em g		
Azeite	Amostras	A	B	C
	1	0,511	0,501	0,502
	2	0,510	0,509	0,503
	3	0,519	0,504	0,501
	4	0,501	0,501	0,500
	5	0,514	0,502	0,502
	6	0,512	0,521	0,504
	7	0,509	0,503	0,509
	8	0,508	0,509	0,502
	9	0,501	0,518	0,519
	10	0,510	0,510	0,518
	11	0,508	0,512	0,511
	12	0,507	0,513	0,502

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.3.1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Com o objetivo de se perceber se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes, foi efetuada uma análise estatística. O teste de Tukey HSD foi utilizado com $P < 0,05$.

O teste de Tukey é um teste estatístico para encontrar os resultados que são diferentes dos outros representativamente e consiste num único processo de várias etapas para comparação, juntamente com uma análise de variância (ANOVA). O teste identifica, onde a diferença entre os dois valores é melhor do que o padrão de erro, que poderia ser esperado. Para a análise estatística foi utilizado o software estatístico SPSS do IBM Statistics, versão 21.

2.3.2. ANÁLISE DISCRIMINANTE

De forma a encontrar, e estudar, possíveis correlações entre o conteúdo nos diferentes metais, e propriedades anteriormente estudadas nos azeites - atividade

antioxidante, rendimento de produção, e estado de maturação - recorreu-se ao método da Regressão Parcial em Mínimos Quadrados (PLS, do inglês "*Partial Least Squares regression*").

Através desta metodologia foram realizadas diversas análises, tendo sido correlacionada, em cada uma delas, uma propriedade conhecida das amostras (variável dependente) com o conteúdo nos diferentes metais (variáveis independentes) das mesmas. Este tipo de metodologia permite não só diferenciar as amostras, relativamente a uma propriedade específica, mas também aferir a preponderância de cada um dos metais analisados para esta diferenciação, correlacionando assim o conteúdo em cada um dos metais com a mesma. Adicionalmente foram levadas a cabo análises classificatórias através de dendograma, produzido com as distâncias euclidianas entre cada grupo, sendo consideradas como diferenciados os grupos com uma distância euclidiana maior ou igual a 0,4 entre si.

Todas as análises mencionadas foram levadas a cabo com recurso ao programa OriginPro, versão 9.1, da *OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA*.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



3.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em consideração que as azeitonas estudadas são material vivo, provenientes de diferentes clones da mesma cultivar Cobrançosa, a variabilidade entre as amostras é grande, o que pode aumentar a probabilidade de erro associada às determinações.

Aquando da preparação da amostra, a quantidade pesada foi de azeitonas provenientes da mesma árvore mas no entanto diferentes azeitonas e, portanto, com características e graus de maturação distintos e uma vez que sabemos que a sua composição química varia em função de um conjunto de fatores, assim será de esperar que os valores obtidos sejam significativamente superiores e daí que se tolere um coeficiente de variação até cerca de 20 %.

Além do anteriormente referido, há ainda que ter em consideração que podem ter sido analisadas partes diferentes da azeitona (ao homogeneizar cada uma das amostras, poderá não ter sido aproveitado para todas elas partes iguais da azeitona, e sabendo que as quantidades de metais na película e polpa podem ser distintas), podem os resultados ser influenciados por este facto.

Para cada uma das amostras produzidas de acordo com cada um dos diferentes clones, foi avaliado o teor em alumínio, arsénio, cádmio, chumbo, cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, níquel, e zinco, tendo todos os metais sido identificados e quantificados em todas as amostras, à exceção do cobalto que não foi detetado em nenhuma das amostras, quer de azeitonas quer de azeites, e do cádmio que não foi detetado numa das amostras de azeites.

Enquanto que na literatura está bem documentado que o teor e a composição da fração fenólica das azeitonas e azeites depende da cultivar, das condições climáticas durante o amadurecimento e do grau de maturação, já no que se refere ao conteúdo em metais para este alimento não há muitos dados reportados na literatura que possam suportar este trabalho (López *et al.*, 2000).

3.2. METAIS DE SEGURANÇA E METAIS DE QUALIDADE

A composição em metais das amostras dos seis clones de azeitona e azeite nos dois estados de maturação serão analisados em separado de acordo com a segurança (alumínio, arsénio, cádmio e chumbo) e a qualidade (cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, níquel e zinco).

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 7 e 8.

3.2.1. METAIS DE SEGURANÇA

Dos diferentes metais pesados difundidos no ambiente, o cádmio, o chumbo, o arsénio e o alumínio, são os apontados como metais com maior risco para a segurança alimentar (Lopes, 2009; Veiga *et al.*, 2009), motivo pelo qual foi efetuada esta análise.

3.2.1.1. ALUMÍNIO

Podemos verificar que dentro deste grupo de metais, o que está presente em maior quantidade é o alumínio, com quantidades que variam entre $16,47 \pm 4,64$ e $77,17 \pm 2,19$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeitonas e entre $103,37 \pm 8,65$ e $158,62 \pm 7,22$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeites.

Apesar de não haver dados na literatura que suportem os nossos resultados, existe uma referência bibliográfica relativa ao conteúdo de alumínio em azeites, na qual são referidos teores entre 19,56 e 70,10 $\mu\text{g/g}$ (López *et al.*, 2000) podendo desta forma ser inferido que os valores por nós obtidos estão elevados. Isto pode dever-se ao facto de o alumínio ser o metal pesado mais comum da crosta terrestre. A presença deste nos alimentos deve-se a vários motivos, não só ao facto de ser um mineral presente naturalmente no meio ambiente, como também por entrar em contacto direto com alimentos através de utensílios ou embalagens (Reilly, 2002).

No caso concreto deste trabalho, o resultado obtido pode estar associado ao método manual utilizado na produção dos azeites (Jamali *et al.*, 2008).

Ao comparar estatisticamente os valores de alumínio determinados, verificou-se que as amostras de azeitonas, de uma maneira geral não são semelhantes, verificando-se no entanto algumas amostras que não apresentam diferenças significativas, nomeadamente as amostras E, G e H e as amostras B e C, como podemos verificar na figura 4. Quando analisado este resultado, podemos verificar que não há qualquer correspondência entre o teor de alumínio das amostras de azeitona e o seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, e estado de maturação. Isto porque, amostras com teores estatisticamente semelhantes em termos de teor em alumínio são

simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

Alumínio

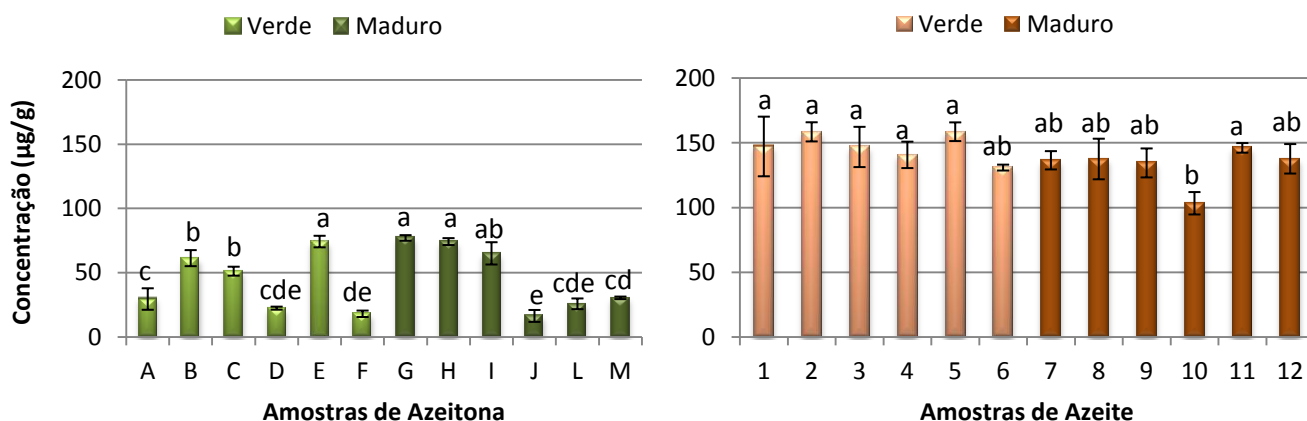


Figura 4. Concentração de Al (µg/g) em amostras de azeitonas e azeites.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

No caso das amostras de azeite, verifica-se que existe uma correspondência entre o teor de alumínio e o estado de maturação, uma vez que, de uma maneira geral, amostras no estado verde e no estado maduro não apresentam diferenças significativas entre si, não sendo no entanto diferentes das restantes amostras, excetuando a amostra 10.

No caso da amostra 11, sendo esta correspondente ao único clone de baixa atividade antioxidante e alto rendimento, podemos verificar que não é influenciada pelo seu estado de maturação, uma vez que, não apresenta diferenças significativas em relação à amostra 5, sendo esta relativa ao mesmo clone no estado verde.

Relativamente à amostra 10, representa o único clone quer com baixa atividade antioxidante quer com baixo rendimento de produção, podendo ser a razão de no estado maduro, ser diferente das restantes amostras.

Em termos quantitativos, a seguir ao alumínio, encontra-se o chumbo e o arsénio, estando o cádmio presente em menores quantidades.

A portaria nº 246/2000, de 4 de Maio, define as características do azeite e do óleo de bagaço de azeitona destinados ao consumidor final, em que

o chumbo, o arsênio e o cádmio são apresentados como contaminantes, cuja concentração máxima admitida é de 0,1 mg/Kg.

3.2.1.2. CHUMBO

Assim sendo, relativamente às amostras de azeites, os valores obtidos para estão compreendidos entre $0,54 \pm 0,05$ e $1,41 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$. Podemos então concluir que se encontram superiores ao limite legal permitido (0,1 mg/Kg). Elevados níveis de chumbo podem estar relacionados com várias fatores, tais como: solo, tratamento e equipamento de moagem.

Os valores obtidos nas azeitonas para o Chumbo variam entre $0,39 \pm 0,16$ e $0,89 \pm 0,63$ $\mu\text{g/g}$. Foi encontrada uma referência bibliográfica que define que o limite legal de chumbo em azeitonas é 1mg/Kg (Codex Alimentarius, 1987). Comparando com esta referência podemos concluir que os valores obtidos estão dentro do limite.

Comparando com estudo feito por Sahan *et al.*, (2006), (0,56 – 0,91 mg/Kg), podemos também verificar que os nossos resultados são semelhantes.

Ao comparar as amostras de azeitonas, verificou-se que o teor de chumbo não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, todas as amostras são estatisticamente semelhantes entre si, como podemos verificar na figura 5.

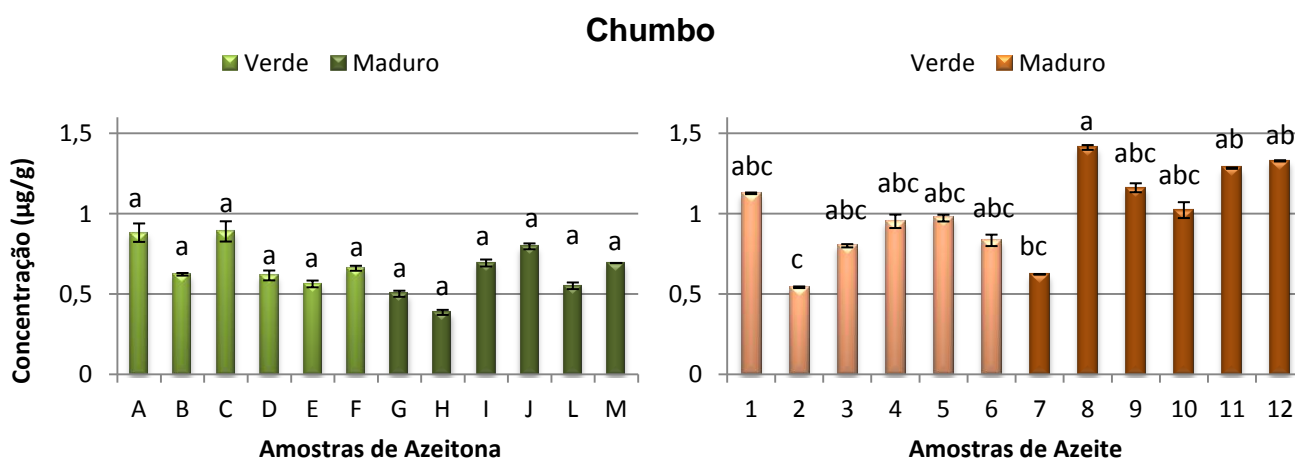


Figura 5. Concentração de Pb ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0,005$).

Ou seja, amostras com teores de chumbo que não apresentem diferenças significativas são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

Relativamente às amostras de azeite, verifica-se que no estado verde as amostras não apresentam diferenças significativas entre si. No entanto não há qualquer correspondência entre o teor de chumbo e o estado de maturação, uma vez que as amostras 9 e 10, não apresentam diferenças significativas às do estado verde e encontram-se no estado maduro. As amostras 11 e 12, apesar de não apresentarem diferenças significativas, nada têm em comum a não ser o estado de maturação.

Podemos também verificar que, não há qualquer correspondência entre o teor de chumbo das amostras de azeite e o seu rendimento de produção e respetiva atividade antioxidante. Isto porque, amostras com teores estatisticamente semelhantes em termos de teor em chumbo são simultaneamente amostras quer com alto e baixo rendimento de produção quer com alta e baixa atividade antioxidante.

3.2.1.3. ARSÉNIO

Relativamente às amostras de azeite, determinaram-se teores de arsénio compreendidos entre $0,42 \pm 0,04$ e $0,66 \pm 0,05$ $\mu\text{g/g}$. Podemos então concluir que, comparando com o limite legal permitido ($0,1$ mg/Kg), se encontram superiores.

Quanto às amostras de azeitonas, os valores obtidos variam entre $0,09 \pm 0,04$ e $0,23 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$, não tendo sido encontrados no entanto, nenhuns dados na literatura que nos possam estabelecer um termo de comparação.

Ao comparar estatisticamente os valores de arsénio determinados, verificou-se que as amostras de azeitonas, de uma maneira geral não são semelhantes, verificando-se no entanto algumas amostras que não apresentam diferenças significativas, nomeadamente as amostras A, G, H, I e L e as amostras B, C, D, F, J e M, como podemos verificar na figura 6.

Arsénio

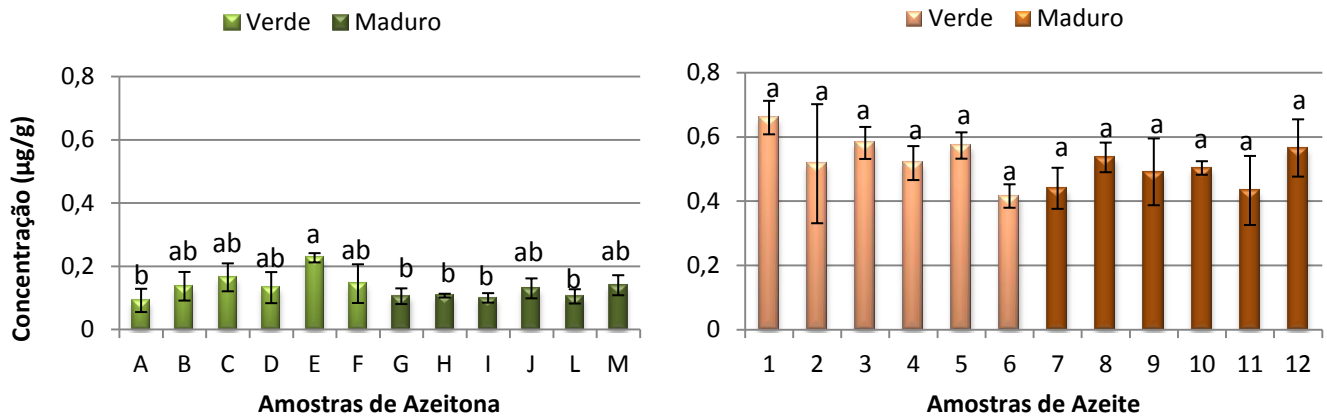


Figura 6. Concentração de As ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

Quando analisado este resultado, podemos verificar que não há qualquer correspondência entre o teor de arsénio das amostras de azeitona e o seu estado de maturação, uma vez que, no caso das amostras A e G, D e J e F e M, estas não apresentam diferenças significativas, sendo relativas ao mesmo clone (em diferentes estados de maturação), logo com o mesmo rendimento de produção e a mesma atividade oxidante.

No caso da amostra E, apresenta uma diferença significativa da amostra A, podendo dever-se ao facto de ser a única de no estado verde, apresentar um baixo rendimento de produção e uma elevada atividade antioxidante.

Ao comparar as amostras de azeite, verificou-se que o teor de arsénio não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, todas as amostras não apresentam diferenças significativas entre si.

Ou seja, amostras que não apresentam teores em arsénio estatisticamente diferentes, são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

3.2.1.4. CÁDMIO

Os valores de cádmio obtidos nas amostras de azeite, variam entre não detetável e $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$. Comparando com vários estudos efetuados em que foram encontrados valores de $0,0028 \pm 0,0001 \mu\text{g/g}$ (Pehlivan *et al.*, 2008), $0,05 \mu\text{g/g}$ (Cindric *et al.*, 2007) e $0,00008 - 0,000366 \pm 19,7 \mu\text{g/g}$ (Benincasa *et al.*, 2007), podemos verificar que os nossos valores se encontram em concordância.

Analisando os resultados para as amostras de azeitonas, verifica-se que os níveis de Cádmio são baixos, encontram-se a variar entre $0,01 \pm 0,00$ e $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$. Estes valores são muito inferiores com os valores obtidos no Egito ($3,2 - 8,1 \text{ mg/Kg}$), mas apenas ligeiramente inferiores com os obtidos na Grécia ($0,06 \text{ mg/Kg}$) (Madejan *et al.*, 2006; Ziena *et al.*, 1997). Quando comparados com o estudo feito por Sahan *et al.* (2006), ($0,08 - 0,16 \text{ mg/Kg}$) verifica-se também, que nas nossas amostras, o teor de cádmio é menor.

Ao comparar estatisticamente os valores de cádmio determinados, nas amostras de azeitonas, podemos verificar que, não há qualquer correspondência entre o teor de cádmio e o seu estado de maturação, uma vez que, no caso das amostras E e L, e F e M, estas não apresentam valores significativamente diferentes, sendo relativas ao mesmo clone, logo com o mesmo rendimento de produção e a mesma atividade oxidante, mas estado de maturação diferente, como podemos verificar na figura 7.

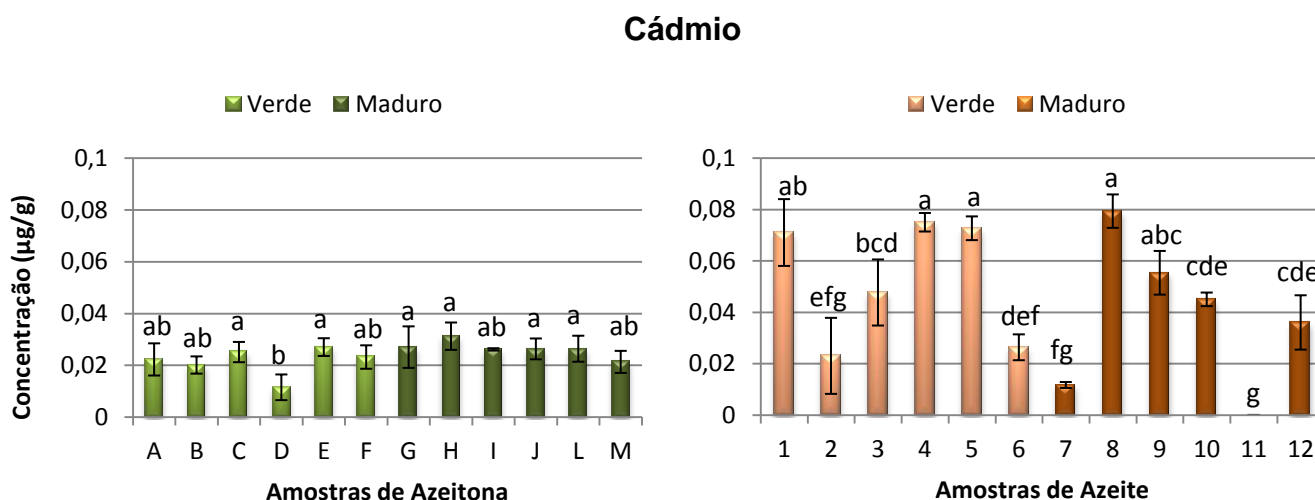


Figura 7. Concentração de Cd ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0,005$).

As amostras A, B, F, I e M não são estatisticamente diferentes quanto ao teor em cádmio, podendo este facto estar associado à sua atividade antioxidante, ou seja, todas estas amostras têm em comum uma elevada atividade antioxidante, apesar de apresentarem estados de maturação e rendimento de produção diferentes.

No caso da amostra D, esta apresenta diferenças significativas da maior parte das amostras, podendo dever-se ao facto de ser a única de, no estado verde, apresentar um baixo rendimento de produção e uma baixa atividade antioxidante.

Ao comparar estatisticamente os valores de cádmio determinados, para as amostras de azeite, verificou-se que, de uma maneira geral apresentam diferenças significativas, verificando-se no entanto algumas amostras que não apresentam diferenças, nomeadamente as amostras 4, 5 e 8 e as amostras 10 e 12. Quando analisado este resultado, podemos verificar que não há qualquer correspondência entre o teor de cádmio das amostras de azeite e o seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante e estado de maturação. Isto porque, amostras com teores estatisticamente semelhantes em termos de teor em cádmio são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, quer com alto e baixo rendimento de produção e com alta e baixa atividade antioxidante.

No entanto, as amostras 10 e 12 não apresentam diferenças significativas e partilham o mesmo estado de maturação e um baixo rendimento de produção. No entanto, não se pode efetuar uma correlação uma vez que, a amostra 8 também tem um baixo rendimento e o mesmo estado de maturação e é estatisticamente diferente.

3.2.2. METAIS DE QUALIDADE

3.2.2.1. FERRO

Relativamente aos metais de qualidade, aquele que está presente em maior quantidade é o ferro, com teores a variar entre os $16,15 \pm 1,67$ e $33,08 \pm 4,20$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeitonas e $17,91 \pm 1,84$ e $43,49 \pm 1,50$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeite.

Segundo um estudo efetuado em azeites (Zeiner *et al.*, 2005), foi determinado um teor de ferro compreendido entre 13,10 e 18,46 $\mu\text{g/g}$. Em comparação com estes valores, verifica-se que os valores por nós obtidos se encontram superiores, uma vez que nas amostras de azeites 7, 8 e 12 foi verificado um teor de ferro superior ao das restantes amostras. Por outro lado, os nossos resultados, quando comparados com os obtidos por Llorent-Martínez *et al.* (2011b) (120 $\mu\text{g/g}$) e por Mendil *et al.* (2009) (139 $\mu\text{g/g}$), verificam-se que são inferiores. Mais uma vez esta discrepância pode estar relacionada com a metodologia utilizada na produção dos azeites. Além disso, no nosso estudo estamos a analisar azeites monovarietais (todos da mesma cultivar, mas com características genéticas distintas, e os estudos apresentados na literatura nada referem relativamente ao tipo de azeite em estudo).

O ferro está presente nos azeites como resultado de contaminações ao longo do processamento e armazenamento (Mendil *et al.*, 2009; Zeiner *et al.*, 2010).

Vários estudos foram feitos para determinar os níveis de ferro nas azeitonas. Os nossos resultados ($16,15 \pm 1,67$ e $33,08 \pm 4,20$ $\mu\text{g/g}$) são semelhantes aos obtidos por Sahan *et al.* (2006) (4,45 – 48,58 mg/Kg), mas ligeiramente superiores aos obtidos por Vavoulidou *et al.* (2004) (26 – 31 mg/Kg). De acordo com os resultados de outros estudos, a maturação, a variedade de azeitona e as condições de produção influenciam os valores de ferro nas azeitonas (Madejan *et al.*, 2006; Nergiz & Engez, 2000; Ziena *et al.*, 1997).

Ao comparar estatisticamente os valores de ferro nas amostras de azeitonas podemos verificar que, de uma maneira geral as amostras não apresentam diferenças significativas entre si, à exceção das amostras A, C, e H, como podemos verificar na figura 8.

Relativamente às amostras D e J, E e L e F e M, podemos concluir que o teor de ferro nada tem a ver com o estado de maturação, uma vez que, as amostras não apresentam diferenças estatisticamente e pertencem ao mesmo clone, ou seja, com iguais rendimentos de produção e atividades antioxidantes, mas com estados de maturação diferentes.

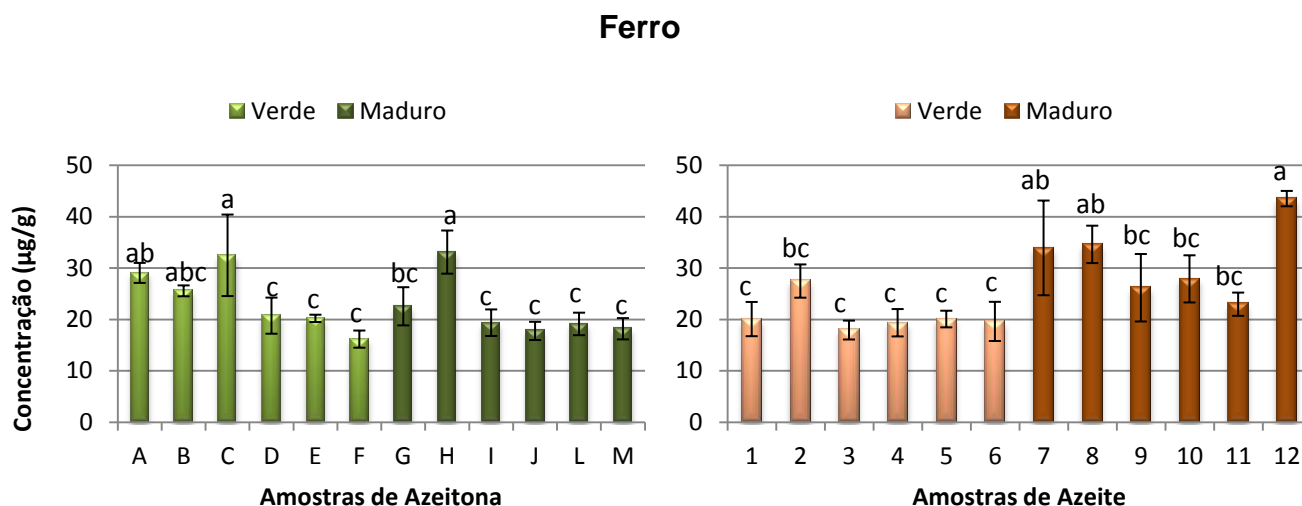


Figura 8. Concentração de Fe ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

As amostras C e H, apesar de não apresentarem diferenças significativas, apresentam estados de maturação e rendimento diferentes, no entanto, apresentam elevada atividade antioxidante, mas não há qualquer correspondência, isto porque, amostras com teores estatisticamente semelhantes em termos de ferro são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção e com alta e baixa atividade antioxidante.

Relativamente às amostras de azeite, verifica-se que no estado verde as amostras não são estatisticamente diferentes entre si. Poderia desta forma, verificar-se uma correspondência entre o teor de ferro nas amostras de azeite e o estado de maturação, mas no estado maduro as amostras também apresentam diferenças estatísticas.

As amostras 7 e 8, apesar de não serem estatisticamente diferentes, apresentarem o mesmo estado de maturação e uma atividade antioxidante elevada, não apresentam uma correlação uma vez que a amostras 9 e 12 também partilham das mesmas características e apresentam diferenças significativas.

Podemos então verificar que não há qualquer correspondência entre o teor de ferro das amostras de azeite e o seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante e estado de maturação.

Seguidamente, os metais que estão presentes em maior quantidade nas amostras são o Manganês e o Níquel.

3.2.2.2. MANGANÊS

O Manganês apresenta valores compreendidos entre $2,08 \pm 0,30$ e $3,50 \pm 0,35$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeitonas e $2,70 \pm 0,35$ e $3,95 \pm 0,89$ $\mu\text{g/g}$ para as amostras de azeites.

Não foram encontradas quaisquer referências sobre o teor máximo de Manganês permitido por lei. No entanto quando comparados os valores de Manganês por nós obtidos para as amostras de azeites ($2,70 \pm 0,35$ e $3,95 \pm 0,89$ $\mu\text{g/g}$), com os valores obtidos por Zeiner et al. (2010) ($0,06$ $\mu\text{g/g}$), e os valores obtidos por Mendil et al. (2009) ($0,04$ $\mu\text{g/g}$) podemos verificar que os nossos valores se encontram muito superiores.

O processamento do azeite pode aumentar os níveis de manganês na matéria-prima, mas a influência dos níveis de manganês no solo é mais relevante (Roca *et al.*, 2000).

Comparando estatisticamente os valores de manganês para as azeitonas, verifica-se que de uma maneira geral as amostras não apresentam diferenças significativas, à exceção das amostras C, I e L que apresentam diferenças significativas da amostra H, como podemos verificar na figura 9.

Podemos verificar que não existe qualquer correspondência entre o teor de manganês e o seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante e estado de maturação, isto porque, amostras com teores de manganês que não são estatisticamente diferentes, são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção e com alta e baixa atividade antioxidante.

Ao comparar as amostras de azeite, verificou-se que o teor de manganês não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, todas as amostras são estatisticamente semelhantes entre si.

Manganês

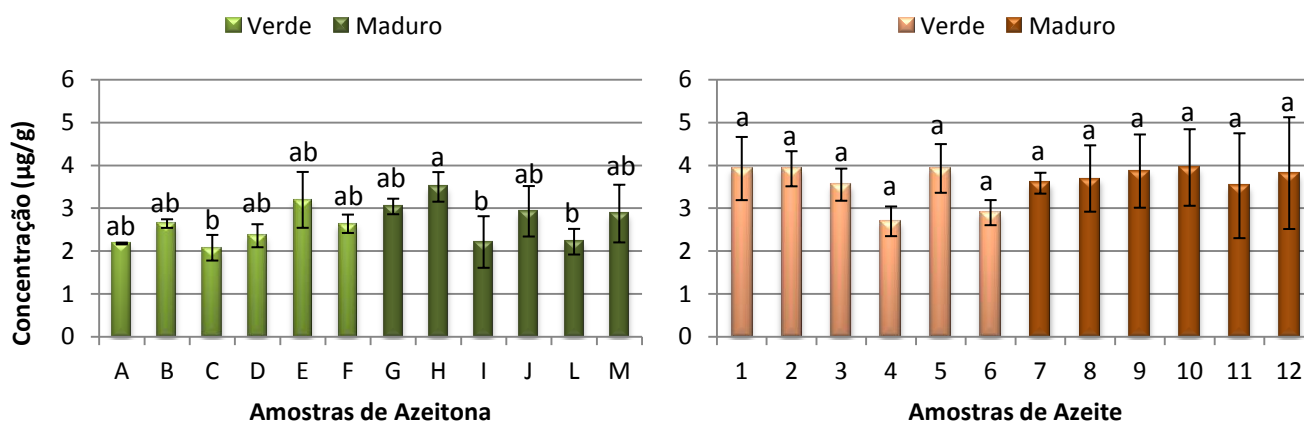


Figura 9. Concentração de Mn ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

3.2.2.3. NÍQUEL

Não foram encontradas quaisquer referências sobre o teor máximo de Níquel permitido por lei. No entanto, comparando os valores por nós obtidos nas amostras de azeites ($1,12 \pm 0,08 - 2,89 \pm 0,54 \mu\text{g/g}$) com um estudo efetuado por Zeiner *et al.* (2005), em que os valores observados estão compreendidos entre 0,07 e 2,26 $\mu\text{g/g}$, podemos concluir que os nossos valores se encontram em concordância.

No caso das azeitonas, os níveis de Níquel por nós determinados encontram-se entre $0,72 \pm 0,11$ e $4,41 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$, verificando-se assim que são ligeiramente superiores comparando com o estudo realizado por Madejan *et al.* (2006), em que os valores encontrados variam entre 1 e 3 mg/Kg. Esta diferença pode ser explicada pelas diferenças de composição do ar e do solo (Konarski *et al.*, 2006; Recatalá *et al.*, 2006; Tasdemir *et al.*, 2006).

Comparando estatisticamente os valores de níquel para as azeitonas, verifica-se que de uma maneira geral as amostras não apresentam diferenças significativas, principalmente no estado de maturação maduro, como podemos verificar na figura 10.

Níquel

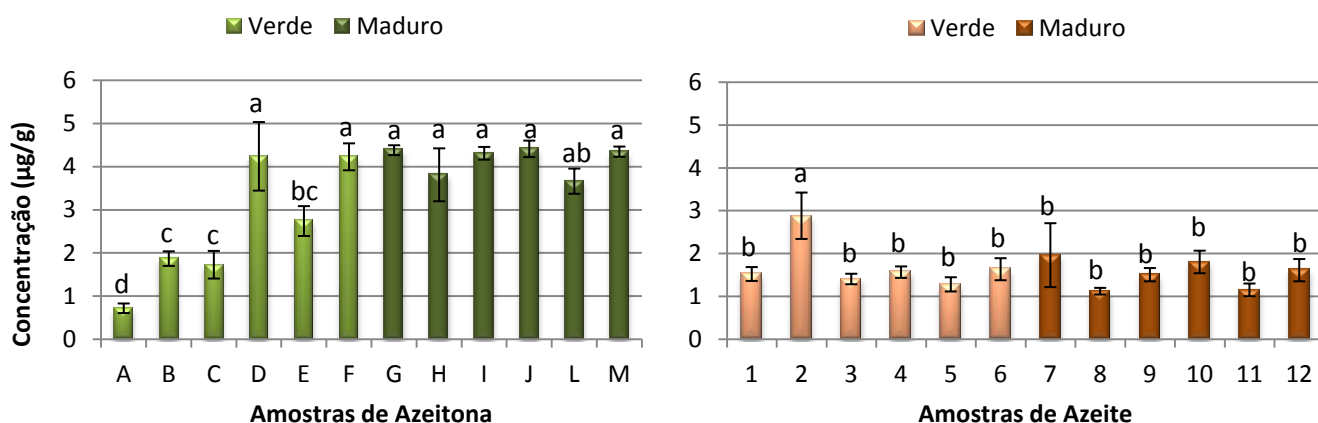


Figura 10. Concentração de Ni ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

Poderia dizer-se que existiria uma correspondência entre o teor de níquel nas azeitonas e o estado de maturação, não fossem as amostras D e F, que apresentam um estado de maturação verde, e não apresentam diferenças significativas às do estado maduro.

Podemos verificar que as amostras B e C não apresentam diferenças significativas, apresentam o mesmo estado de maturação e uma elevada atividade antioxidante. No entanto as amostras A e F apresentam as mesmas condições e são estatisticamente diferentes.

Verifica-se também que as amostras E e L apresentam diferenças significativas entre elas, bem com as outras amostras. Isto pode dever-se ao clone em si, uma vez que são do mesmo clone, apresentando apenas estados de maturação diferentes, sendo este o único clone a apresentar uma baixa atividade antioxidante e um elevado rendimento de produção.

Podemos, no entanto, de uma maneira geral verificar que, não existe qualquer correspondência entre o teor de níquel e o seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante e estado de maturação, isto porque, amostras com teores de níquel, estatisticamente diferentes, são simultaneamente de amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção e com alta e baixa atividade antioxidante.

Ao comparar as amostras de azeite, verificou-se que as amostras são estatisticamente semelhantes, exceto a amostra B que apresenta uma diferença significativa de todas as outras. No entanto não podemos estabelecer uma correspondência, uma vez que, apresenta um estado de maturação verde, uma elevada atividade antioxidante e um baixo rendimento de produção. Assim sendo a amostra F, não deveria apresentar uma diferença significativa relativamente à amostra B, uma vez que apresenta as mesmas condições.

Podemos então concluir que o teor de níquel não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação.

Quanto aos restantes metais verifica-se que o Sódio, o Cobre, o Cálcio, o Magnésio e por fim o Zinco são os que estão presentes em menores quantidades, quer nas amostras de azeitonas quer nas de azeite.

Não foram encontrados quaisquer limites legais para estes metais, quer para azeitonas quer para azeites.

3.2.2.4. SÓDIO

Para as amostras de azeite foi determinado um teor de sódio a variar entre $0,17 \pm 0,01$ e $0,46 \pm 0,23$ mg/g. Assim sendo, as nossas amostras de azeite, contêm teores de sódio mais elevados, quando comparados com outros estudos realizados ($0,02$ mg/g (DTU-TCAD, 2001), $0,0527 - 0,0665$ mg/g (TCAF, 2008), $0,0087 \pm 0,008$ mg/g (Mendil *et al.*, 2009)).

Ao comparar estatisticamente os valores de sódio nas amostras de azeitonas, verifica-se que não existem diferenças significativas entre todas as amostras de azeitonas no estado verde. Apesar de existirem 2 amostras no estado maduro que não apresentam valores estatisticamente diferentes, podemos concluir que, neste caso, o teor de sódio pode estar relacionado com o estado de maturação, como se pode verificar na figura 11.

As amostras H e M, não apresentam diferenças significativas relativamente às amostras de estado de maturação verde, apesar de serem amostras com estado de maturação maduro. No entanto, pode existir uma relação entre o teor de sódio das amostras de azeitonas, a atividade

antioxidante e o rendimento de produção, uma vez que, estas duas amostras são as únicas que apresentam um estado de maturação maduro, uma elevada atividade antioxidante e um baixo rendimento de produção.

A amostra L é estatisticamente diferente das outras, podendo este facto dever-se a ser a única amostra no estado maduro, a apresentar uma baixa atividade antioxidante e um elevado rendimento de produção.

Sódio

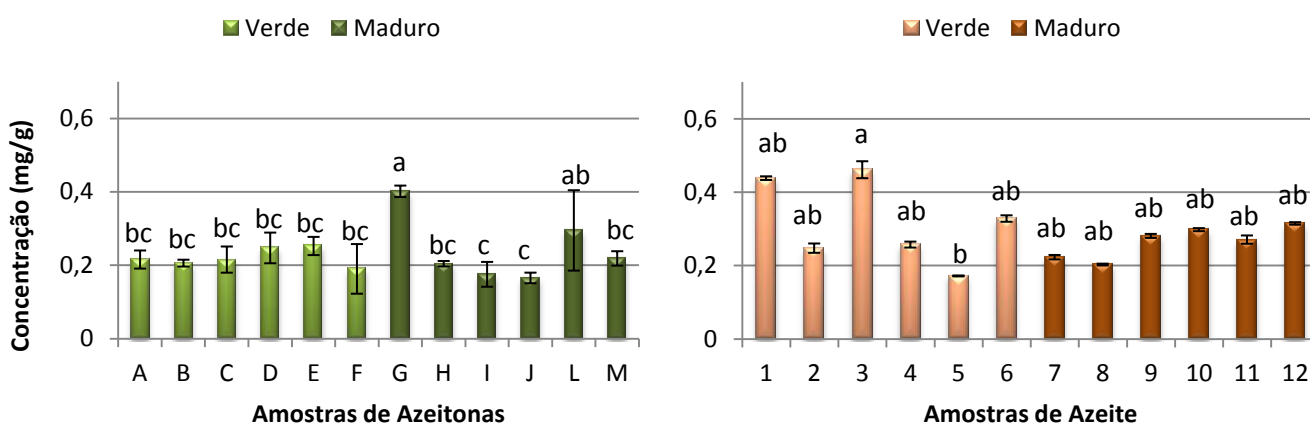


Figura 11. Concentração de Na (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

Quanto às amostras de azeite, podemos concluir que, de uma maneira geral as amostras não apresentam diferenças significativas, exceto as amostras 3 e 5, que apresentam diferenças significativas entre si. Poderia efetuar-se uma correspondência entre o estado de maturação e o rendimento de produção, uma vez que são amostras no estado verde e com elevado de rendimento de produção, não fosse a amostra A, apresentar as mesmas condições e ser estatisticamente semelhante às restantes amostras.

3.2.2.5. COBRE

Relativamente ao Cobre, os valores obtidos para as amostras de azeitonas foram de $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ enquanto nas amostras de azeites os valores encontram-se entre $0,07 \pm 0,00$ e $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$.

No caso dos azeites, os valores obtidos estão de acordo com um estudo efetuado (Zeiner *et al.*, 2005), uma vez que os resultados obtidos por eles se encontram entre 0,04 e 4,51 $\mu\text{g/g}$, estando desta forma os resultados por nós obtidos em concordância. Os nossos resultados são também semelhantes com os obtidos por Llorent-Martínez *et al.* (2011b) em azeite extra virgem (inferior a 8 $\mu\text{g/g}$). Contudo, níveis mais elevados de cobre foram reportados por Zeiner *et al.* (2010) para azeite virgem (0,16 $\mu\text{g/g}$), e por Mendil *et al.* (2009) com conteúdos de cobre de 0,71 $\mu\text{g/g}$.

As amostras analisadas não excederam o limite máximo de 0,1 mg/Kg imposto (COI, 2006) para o azeite.

De todos os metais, o Cobre é o de maior importância porque todos os pesticidas e fungicidas contêm na sua composição cobre, e estes são utilizados para o tratamento das oliveiras. Para além disso, o Cobre é um metal de transição que, mesmo em pequenas concentrações, é um potente catalisador oxidativo. Tendo em conta o alto conteúdo de lípidos nas azeitonas, os resíduos de Cu devem ser determinados, de maneira a controlar a sua influência na qualidade do produto final (Soares *et al.*, 2006).

Todas as amostras de azeitonas estudadas, apresentam um conteúdo em cobre inferior a 6 mg/Kg, limite recomendado pelo Turkish Local Food Standards (TSE, 2003).

Ao comparar as amostras, quer de azeitonas quer de azeite, verificou-se que o teor de cobre não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, as amostras em estudo não apresentam diferenças significativas entre si, como se pode verificar na figura 12.

Ou seja, amostras com teores em cobre que não sejam estatisticamente significativas as diferenças, são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

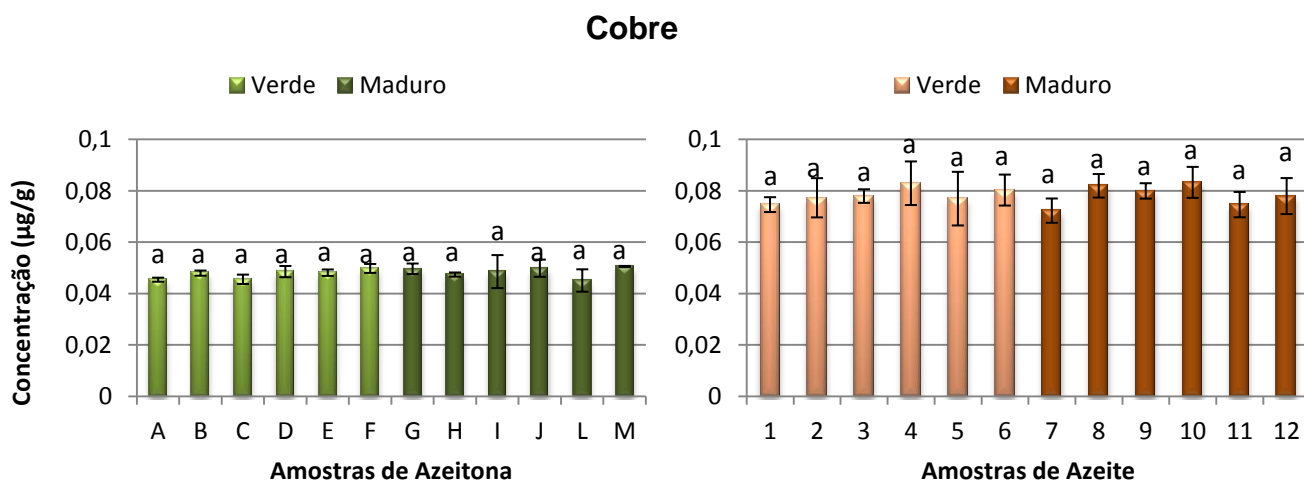


Figura 12. Concentração de Cu ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

3.2.2.6. CÁLCIO

Nas amostras de azeite, foram determinados teores de cálcio que variam entre $0,05 \pm 0,01$ e $0,07 \pm 0,01 \text{ mg/g}$. Comparando com vários estudos efetuados, onde foram encontrados valores de $0,01 \text{ mg/g}$ (DTU/TCAD, 2001), $0,0185 \text{ mg/g}$ (TCAF, 2008) e $0,0018 - 0,027 \pm 2,7 \text{ mg/g}$ (Benincasa *et al.*, 2007), podemos concluir que os valores por nós obtidos se encontram superiores. No entanto, comparando com os valores obtidos por Mendil *et al.* (2009) $0,076 \pm 0,0075 \text{ mg/g}$, podemos verificar que, neste caso, se encontram em concordância.

Ao comparar estatisticamente os resultados obtidos para o cálcio, nas amostras de azeitonas, verifica-se que as amostras A, B, C, G e M não são significativamente diferentes entre si, assim como as amostras E, F, H, I e L, como podemos verificar na figura 13.

Podemos verificar que não existe qualquer correspondência entre o teor de cálcio e o estado de maturação, uma vez que existem amostras sem diferenças significativas, quer no estado verde, quer no estado maduro.

No entanto, pode existir uma relação entre o teor de cálcio e a atividade antioxidante, uma vez que, apesar de existirem outras amostras com as mesmas características e serem diferentes estatisticamente, as amostras A, B, C, G e M têm todas em comum, uma elevada atividade antioxidante.

As amostras D e J, apesar de apresentarem diferenças significativas, diferenciam-se de todas as outras. Isto pode ser devido ao facto de pertencerem ao mesmo clone, e este clone ser o único a apresentar uma baixa atividade antioxidante e um elevado rendimento de produção.

Cálcio

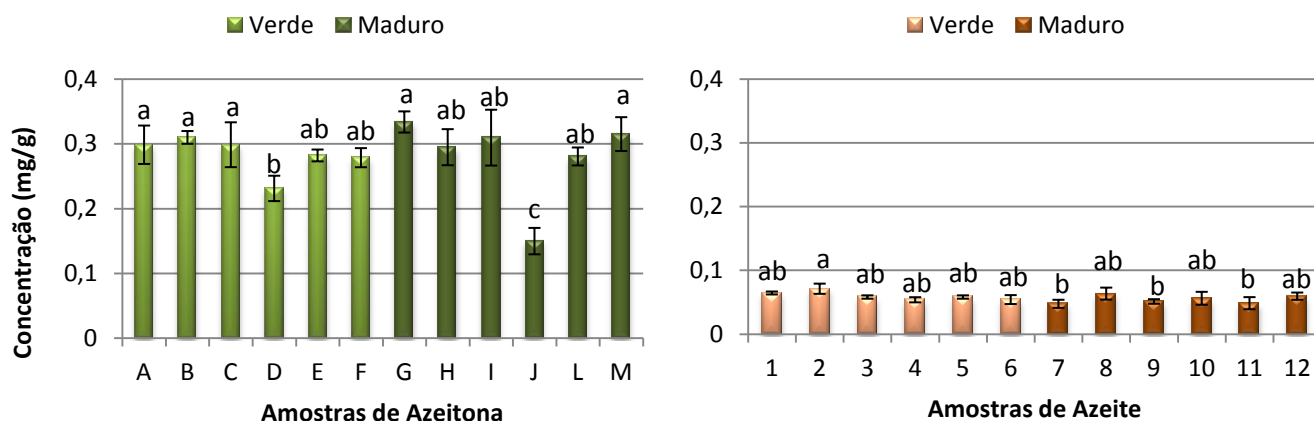


Figura 13. Concentração de Ca (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$).

Analisando as amostras de azeite, podemos concluir que as amostras não apresentam diferenças significativas, exceto a amostra 2 com as amostras 7, 9 e 11.

Podemos verificar uma relação entre o teor de cálcio, o estado de maturação e o rendimento de produção, uma vez que, as amostras 7, 9 e 11 não apresentam diferenças significativas e são as únicas no estado de maturação maduro a apresentar um elevado rendimento de produção. Todas as restantes no estado maduro, apresentam um baixo rendimento de produção, não apresentando no entanto, diferenças significativas às do estado de maturação verde. Assim sendo, todas as amostras no estado verde e no estado de maturação maduro mas com baixo rendimento e não apresentam diferenças significativas

3.2.2.7. MAGNÉSIO

Relativamente às amostras de azeite, foram encontrados valores de magnésio a variar entre $0,02 \pm 0,00$ e $0,04 \pm 0,01$ mg/g. Valores estes que se encontram significativamente elevados quando comparados com os valores obtidos por Benincasa *et al.* (2007), Cindric *et al.* (2007) e por Mendil *et al.* (2009). Isto pode dever-se ao facto de a composição química dos fertilizantes, uma vez que contêm Fe, Mg, Mn e Zn em diferentes proporções.

Ao comparar as amostras de azeitonas verificou-se que, o teor de magnésio não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, todas as amostras não apresentam diferenças significativas, como se pode verificar na figura 14.

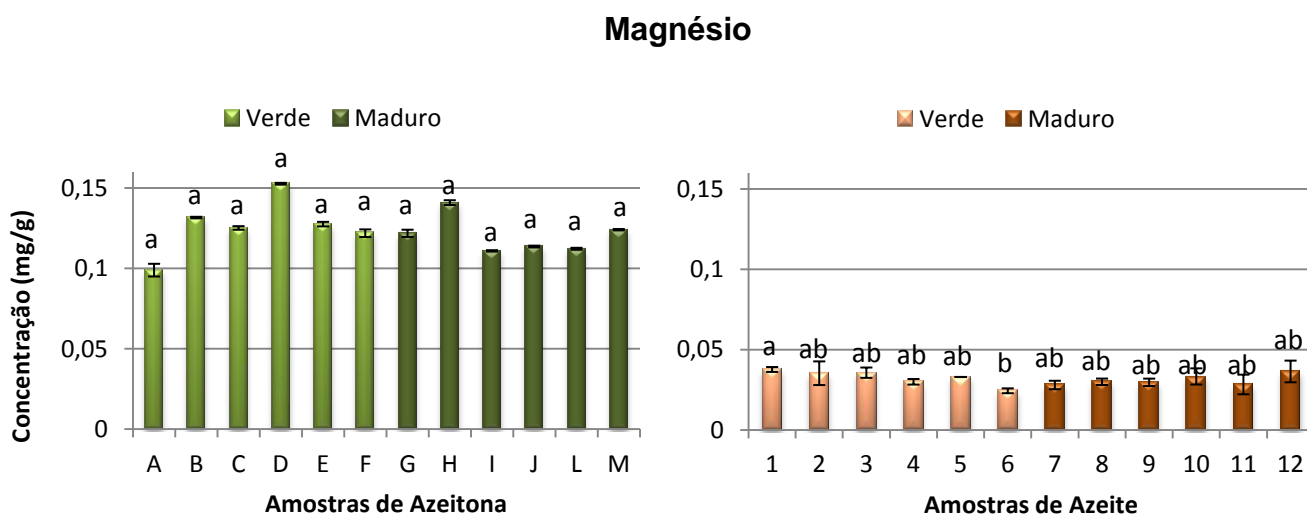


Figura 14. Concentração de Mg (mg/g) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0,005$).

Ou seja, amostras com teores de magnésio que não sejam estatisticamente diferentes entre si, são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

Relativamente às amostras de azeite, podemos verificar que as amostras não apresentam diferenças significativas, excetuando as amostras 1 e 6 que apresentam diferenças significativas entre si. Isto poderia dever-se ao

facto de, serem amostras no estado de maturação verde com alta atividade antioxidante, mas esta relação não se pode fazer uma vez que, as amostras 2 e 3 apresentam as mesmas características e não apresentam diferenças significativas relativamente às restantes.

Podemos então verificar que, não existe qualquer correspondência entre o teor de magnésio e o seu rendimento de produção, respetiva acidez antioxidante e estado de maturação, isto porque, amostras com teores estatisticamente semelhantes em termos de magnésio são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção e com alta e baixa atividade antioxidante.

3.2.2.8. ZINCO

Os níveis de Zinco analisados nas azeitonas variam entre $0,03 \pm 0,01$ e $0,05 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$. Um estudo efetuado por Sahan *et al.* (2006), determinou valores de zinco a variar entre 4,25 e 14,30 mg/Kg, encontrando-se estes valores muito superiores, quando comparados com os valores por nós obtidos.

Esta grande diferença pode dever-se à matéria-prima (variedade, origem do fruto e período de maturação) e aos diferentes métodos de processamento.

Relativamente às amostras de azeite, verificou-se um teor de zinco a variar entre $0,04 \pm 0,01$ e $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$. No entanto, verifica-se um teor de zinco muito elevado quando comparado com outros estudos realizados ($0,1\text{E}^{-3}$ mg/g (TCAF, 2008); $0,0523\text{E}^{-3} \pm 0,0029$ mg/g (Pehlivan *et al.*, 2008); $0,09\text{E}^{-3}$ mg/g (Cindric *et al.*, 2007); $0,1\text{E}^{-3} \pm 0,001$ mg/g (Mendil *et al.*, 2009)). Esta diferença pode dever-se aos fertilizantes que são usados na olivicultura. A dose diária recomendada de zinco é de 15 mg para os adultos masculinos e 12 mg para os adultos femininos (Mendil & Tuzen, 2011), observando-se assim que os resultados por nós obtidos estão dentro dos limites. No entanto, sabe-se que a dose diária total recomendada de zinco tem de ser proveniente de várias fontes e não só do azeite.

Ao comparar os níveis de zinco das amostras, tanto de azeitonas como de azeite, verificou-se que estas não apresentaram diferenças significativas, como podemos verificar na figura 15.

Zinco

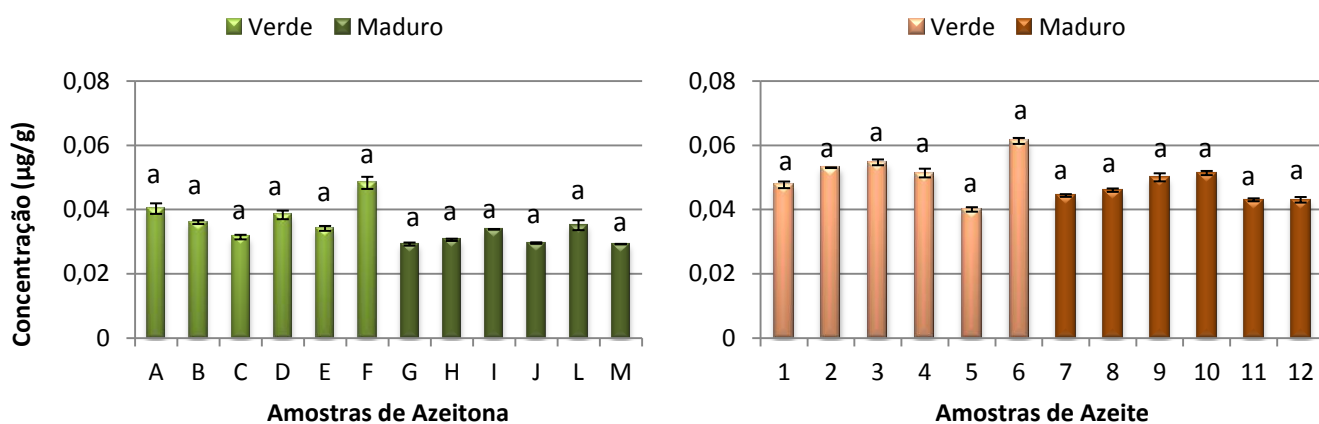


Figura 15. Concentração de Zn ($\mu\text{g/g}$) em amostras de azeitona e azeite.

Letras diferentes indicam que as amostras são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0.005$)

Assim sendo, pode-se concluir que o teor de zinco não é influenciado pelo seu rendimento de produção, respetiva atividade antioxidante, nem pelo seu estado de maturação, uma vez que, todas as amostras não apresentam diferenças significativas entre si.

Ou seja, amostras com teores de zinco que não apresentem diferenças significativas, são simultaneamente amostras quer no estado verde quer no estado maduro, com alto e baixo rendimento de produção, e com alta e baixa atividade antioxidante.

3.3. ANÁLISE MULTIVARIADA

Foi realizada a análise por PLS (Partial Least Squares) relativamente ao estado de maturação dos azeites, o que permitiu discriminar 42,77% da variância das amostras, sendo que o fator 1 permitiu discriminar 21,40% sendo o conteúdo de Cálcio e Ferro as variáveis com maior contribuição neste fator. O fator 2 permitiu discriminar 21,37% sendo o conteúdo de Magnésio e Manganês as variáveis com maior contribuição. A projeção relativa a esta análise encontra-se na figura 16.

A partir da análise em componentes principais juntamente com a análise de *clusters*, foi possível agrupar as nossas amostras em quatro grupos distintos, sendo dois grupos constituído pelas amostras no estado de maturação maduro, que diferem dos restantes de acordo com o fator 1. Os outros dois grupos são constituídos pelas amostras no estado de maturação verde.

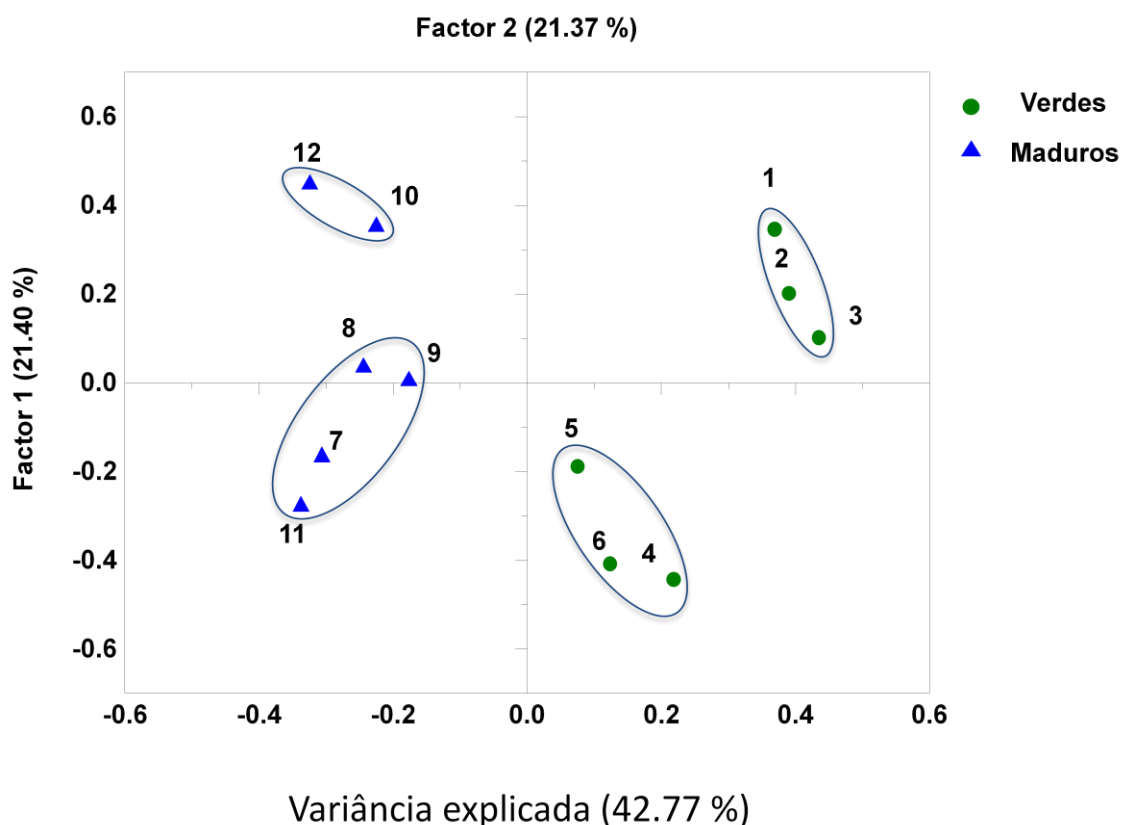


Figura 16. Discriminação das amostras relativamente ao estado de maturação em função do conteúdo em metais.

A análise por PLS (Partial Least Squares) relativamente à atividade antioxidante dos azeites, foi realizada e permitiu discriminar 36,11% da variância das amostras, sendo que o fator 1 permitiu discriminar 20,86% sendo o conteúdo de Cálcio, Níquel e Magnésio as variáveis com maior contribuição neste fator. O fator 2 permitiu discriminar 15,25% sendo o conteúdo de Arsénio, Cádmiio e Magnésio as variáveis com maior contribuição. A projeção relativa a esta análise encontra-se na figura 17.

A partir da análise em componentes principais juntamente com a análise de *clusters*, foi possível agrupar as nossas amostras em quatro grupos distintos, sendo dois grupos constituídos pelas amostras com alta atividade antioxidante, um grupo constituído pelo clone 5, e um grupo constituído por amostras de baixa e alta atividade antioxidante.

Do lado positivo do fator 1 encontram-se amostras apenas com alta atividade antioxidante. Do lado positivo do fator 2 encontram-se amostras com baixa atividade antioxidante. Na parte negativa também se discriminaram amostras com alta atividade antioxidante estando o clone 11, de baixa atividade antioxidante, também nessa parte, encontrando-se assim fora da tendência. Isto pode dever-se ao facto de o seu conteúdo em Níquel ser similar ao das amostras com elevada atividade antioxidante.

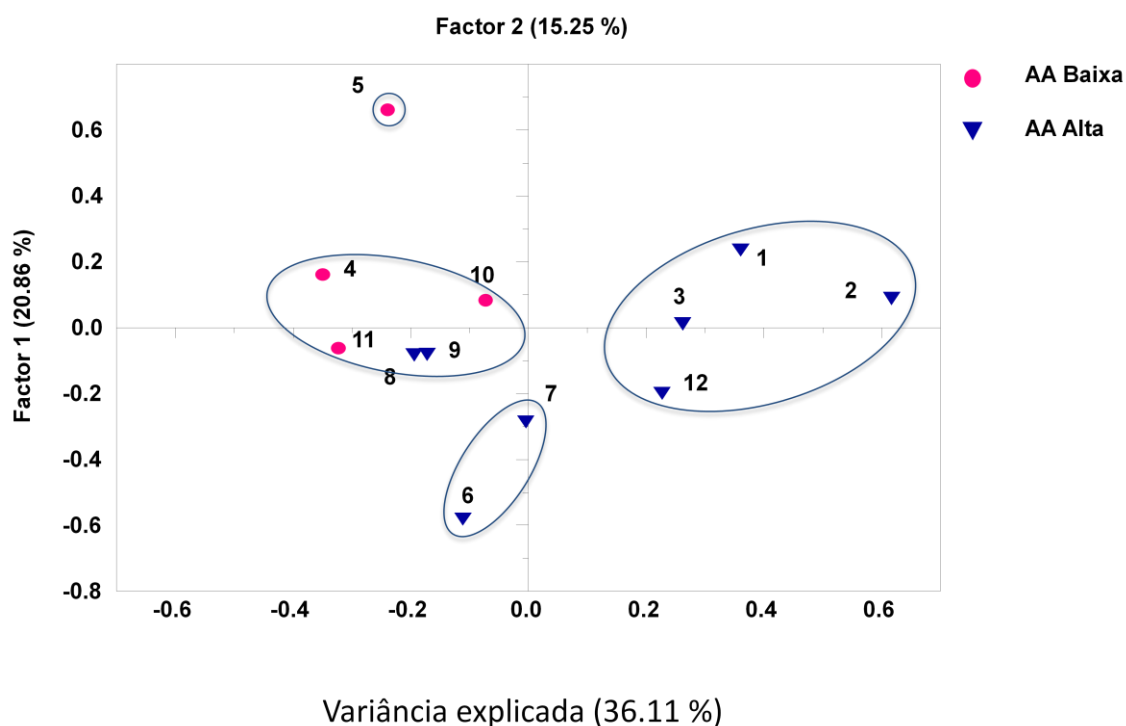


Figura 17. Discriminação das amostras relativamente à atividade antioxidante em função do conteúdo em metais.

A análise em componentes principais relativamente ao rendimento de produção foi realizada, e permitiu discriminar 37,19% da variância das amostras, sendo que o fator 1 permitiu discriminar 15,41% sendo o conteúdo

de Cobre e Zinco as variáveis com maior contribuição neste fator. O fator 2 permitiu discriminar 21,78% sendo o conteúdo de Cálcio e Magnésio as variáveis com maior contribuição. A projeção relativa a esta análise encontra-se na figura 18.

A partir da análise por PLS (Partial Least Squares) juntamente com a análise de *clusters*, foi possível agrupar as nossas amostras em quatro grupos distintos, sendo dois grupos constituído pelas amostras com alto rendimento de produção, que diferem dos restantes de acordo com o fator 1. Os outros dois grupos são constituídos pelas amostras com baixo rendimento de produção.

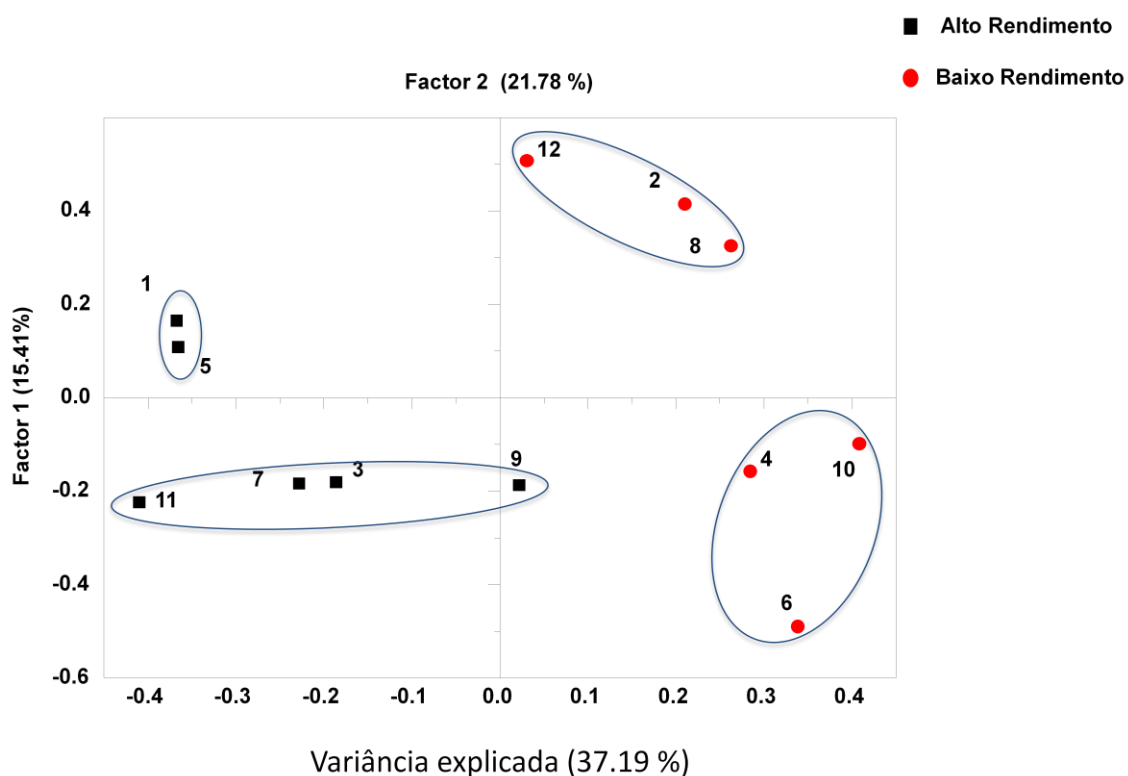


Figura 18. Discriminação das amostras relativamente ao rendimento de produção em função do conteúdo em metais.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES



4.1. CONCLUSÕES

Tendo em consideração que as amostras analisadas neste trabalho se caracterizam por terem diferenças genéticas, diferentes rendimentos de produção, diferentes estados de maturação e diferente teor em compostos fenólicos (o que se traduz numa diferente atividade antioxidante), foi analisado o conteúdo em metais de segurança e qualidade com o intuito de verificar ou não, alguma correlação com os parâmetros anteriormente descritos.

Verificou-se que é possível discriminar as amostras de azeites analisadas de acordo com o estado de maturação, sendo que o cálcio, o ferro, o magnésio e o manganês são os metais que maioritariamente contribuíram para essa discriminação

Verificou-se que é possível discriminar as amostras de azeites analisadas de acordo com o estado de maturação, sendo que o cálcio, o ferro, o magnésio e o manganês são os metais que maioritariamente contribuíram para essa discriminação.

Verificou-se também que é possível discriminar as amostras de azeites analisadas de acordo com a atividade antioxidante, sendo o cálcio, o níquel, o magnésio, o arsénio e o cádmio os metais que maioritariamente contribuíram para essa discriminação.

Por fim, verificou-se também que é possível discriminar as amostras de azeites analisadas de acordo com o rendimento de produção, sendo o cobre, o zinco, o magnésio e o cálcio os metais que maioritariamente contribuíram para essa discriminação.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA



5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFG Alimentar, 2013. Disponível em <http://www.afg.com.pt/alimentar/olive-oilregions/language:PT>. Acedido em Janeiro 2014.

Aparicio, R. (2003). *Manual del aceite de oliva*, Harwood, J., eds.; Madrid Vicente, Ediciones y Mundi-prensa: Madrid, 2003, cap.14.

Baiano, A.; Gambacorta, G.; Notte, E. (2010). *Aromatization of olive Oil*; Transworld research network, 37/661 (2), Fort P.O.Trivandrum-695 023 Índia

Bandino, Giovanni e Sedda, Piergiorgio. 2007. *Manuale di olivicoltura*. Sardegna : s.n., 2007.

Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., (1999). El cultivo del olivo, *Botânica y morfología*, 35 (2): 51-52; *Variedades e patrones*, 61: 72-77.

Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G., (2005). *Olive Germplasm: Cultivars and World-Wide Collections*. FAO, Rome, Italy.

Benedet, J.Á. & Shibamoto, T. (2008). Role of Transition Metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in Lipid Peroxidation. *Food Chemistry*, 107, 165-168.

Benincasa, C., Lewis, J., Perri, E., Sindona, G. & Tagarelli, A. (2007). Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 585(2), 366-370.

Brian M. Tissue, (1996) Science Hypermedia

Casarett e Doull's, (1996). Toxicology – The basic science of poisons. Editor Curtis D. Klassen. PhD. Editors emiriti, Mary O. Amdur, John Doull. 5th ed, International edition. McGraw-Hill.

Catarino, S., Curvelo-Garcia, A. S., Sousa, R. B., (2007). Elementos Contaminantes nos Vinhos. *Ciência Téc. Vitiv.* 22(2) 45-61. Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Química Ag rícola e Ambiental. Lisboa

Cindric, I.J., Zeiner, M. & Steffan, I. (2007). Trace elemental characterization of edible oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchemical Journal*, 85, 136-139.

Charana, A.P.M., (2008). Análise de metais em águas de consumo humano: comparação de métodos. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química – Universidade de Aveiro.

Codex Alimentarius (1987). Codex Standar For Table Olives, Codex Stan 66, 19 p.

COI (International Oil Council), Applicable trade regulations to olive oil and olive residue oil. No. 3/Rev 2; 24 November, 2006.

COI (International Olive Council), Trade Standard Applying to Olive Oils and Olivepomace Oils; COI / T.15 / NC no. 3 / Rev. 3, November, 2008.

Connor, D.J., (2005). Adaptation of olive (*Olea europaea L.*) to water-limited environments. *Australian J. of Agric. Research* 56: 1181-1189.

Connor, D.J.; Fereres, E., (2005). The Psysiology of Adaptation and Yield Expression in Olive. *Horticultural Reviews*, 31: 155-229.

Cooperativa Agrícola dos Olivicultores do Fundão, (2010) www.olivicultoresdofundao.org consultado em Setembro 2013.

Cordeiro, A. M., Calado, M.L., Morais, N., Miranda, A., Carvalho, M.T. (2010). Variedades de azeitona: Cobrançosa. INRB / L-INIA / URGEMP. Vida Rural. Fevereiro, 2010.

Covas, M.I., Konstantinidou, V., Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54 (6), 477-82.

Cunha, S., (2007). Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas. Tese para a obtenção do grau de Doutor. Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Custódio, T. A. S.; (2009); Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade; Dissertação para obtenção do grau de mestre; Universidade do Porto.

De Guevara J. L., Pueyo V. M., (1995). Toxicologia Medica – clínica y laboral. Interamericana – McGraw-Hill, Healthcare group, 1ª ed., Madrid.

Doveri, S., Baldoni, L. (2007). Olive. In: Fruit and Nuts. Kole C (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 254-264.

Duarte, A. P. C. (2003). *Estudo sobre a Influência de Dietas com Gorduras Ricas em Ácidos Monoinsaturados nalguns Parâmetros Hemáticos do Murganho em Condições de Diabetes mellitus*. Trabalho de Fim de Curso de Engenharia de Agro-industrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

DTU-TCAD (2011) – Table of Food Composition of Denmark. National Food Institute-Technical University of Denmark DTU 2001. Consulted in internet in March 2013.

Edlund, M.; Visser, H. & Heitland, P., (2002). Analysis of biodiesel by argon-oxygen mixed-gas inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17, 232-235.

FAOSTAT (2007). "FAO statistical databases. Production. Core production data <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>

Garcia, A. G., (2005). Cultivo Moderno do Olival, Publicações Europa-América.

Geraldes, A.J.M., (2004). *Dioxinas e contaminação ambiental*. Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Toxicologia e Análises Toxicológicas I. Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Gonçalves, M.L.S.S., (2001). Métodos instrumentais para análise de soluções. Fundação Gulbenkian.. 4ª ed., Lisboa, 2-104.

Gopalani, M., Shahare, M., Ramteke, D.S. & Wate, S.R. (2007). Heavy metal content of potato chips and biscuits from Nagpur city, India. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79, 384–387.

Gouveia, J; Saldanha, J; Martins, A; Modesto, M; Sobral, V, (2002), *O azeite em Portugal*, Edições Inapa.

Granados, J. A. (2000). *Enciclopedia del Aceite de Oliva, Historia y Leyendas del aceite y la Aceituna*. Editorial Planeta, Barcelona, 109-114; 357-372. ISBN: 84 08-03542-8.

Gunstone, F (2002); *Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses*, Blackwell Publishing, 1ª Edition

Gutiérrez, A; Carretero, A (2009), *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*; Fundación Unicaja, Espanha..

Herce-Pagliai, C., Moreno, I., González, G., Repetto, M., Cameán, A. M. (2002). Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine. *Food Additives and Contaminants*, A 19, 542-546

Hermoso, M.; Uceda, M.; Frías, L.; Beltrán, G., (2004). Maduración. *En El Cultivo del Olivo*. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (eds.), Cap. VI, Coedición Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 159-183.

Huang, L., Bauer S., (2008). *Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health*, American College of Surgeons 407-416.

INCHEM, World Health Organization (Who). Environmental health criteria for arsenic and arsenic compounds. (Documento na internet) Genebra, Suíça, Universal copyright convention, 2001. (Citado em 15 Março 2006). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>. Acedido em Junho 2013.

INE, (2007a) – Estatísticas Agrícolas 2006. Produção das principais culturas em 2005. Acesso: <http://www.ine.pt> (Acedido em 02/02/2013).

Jamali, M.K., Kazi, T.G., Arain, M.B., Afridi, H.I., Jalbani, N., Sarfraz, R.A. & Baig JA. (2008). A multivariate study: variation in uptake of trace and toxic elements by various varieties of *Sorghum bicolor* L. *Journal of Hazardous Materials*, 158, 644–651.

Janick, J., Paull, R. (2008). *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*. pp 565-574.

Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P., Crowther, J. C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7, 1-26.

Konarski, P., Hajuszka, J., C'wil, M. (2006). Comparison of urban and rural particulate air pollution characteristics obtained by SIMS and SSMS. *Applied Surface Science*, 252, 7010-7013.

Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., Domínguez- Vidal, A., Ruiz-Medina, A. (2011a). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*, 127, 1257–1262.

Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., & Ruiz- Medina, A. (2011b). Analysis of the legislated metals in different categories of olive and olive-pomace oils. *Food Control*, 22, 221–225.

Lopes, A. M., (2009). Avaliação da contaminação em metais pesados no pescado: Análise da situação do pescado comercializado em Portugal e dos alertas emitidos pelo sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Dissertação de Mestrado em 152 Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

López, F.F.; Cabreira, C.; Lorenzo, M. L.; López, M. C., (2000). Aluminum Content in Foods and Beverages Consumed in the Spanish Diet. *JFS Food Chem. and Toxicology.*, 65.

Luchetti, F., (2002). “Importance and future of olive oil in the world market – An introduction to olive oil”. *European Journal of Lipid Science and Tecnology*. Volume 104. Issue 9-10. Pag. 559-563.

Madejan, P., Moranon, T., Murillo, J. M. (2006). Biomonitoring of trace elements in the leaves and fruits of wild olive and holm oak trees. *Science of the Total Environmental*, 355, 187-203.

MADRP, (2007). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Olivicultura – Diagnóstico Sectorial. Gabinete de Planeamento e Políticas.

Mahan, L. K., (2005). Escott-Stump, S. Alimentos , Nutrição e Dietoterapia. Ed. Roca. 11 Ed., P. 162

Matos, M.N. & Campos, R.C. (2006). Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 70, 929–932.

Mella, J. I. F., (2007). Estudio de parâmetros de calidad en frutos de três cultivares de olivo (*Olea europaea L.*) durante la maduración en la región de Trás-os-Montes (Portugal). Relatório de estágio, 6-50.

Mendil, D., Uluözlü, Ö.D., Tüzen, M. & Soylak, M. (2009). Investigation of the Levels of Some Element in Edible Oil Samples Produced in Turkey by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 724-728.

Mendil, D. & Tuzen, M. (2011). Assessment of trace elements in animal tissues from turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182, 423-430.

Miranda, M., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., López-Lamas, C., Merino, A., and López-Alonso, M. (2008), Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: Relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues; *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23, 231-238 Plant Heavy Metal.

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY (eds.), (2004). Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd edition. London-Chicago : Pharmaceutical Press (PhP).

Mustra, C. J. O., (2009). Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metalóides em amostras biológicas. Preparação de amostras por digestão com a tecnologia microondas. Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Lisboa.

Nergiz, C., & Engez, Y. (2000). Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chemistry*, 60, 55-59.

Pancorbo, C. (2006), *Rapid Quantification of the Phenolic Fraction of Spanish Virgin Olive Oils by Capillary Electrophoresis with UV Detection*, *J. Agric. Food Chem.* 54: 7984-7991.

Pasqualone, A., Montemurro, C., Summo, C., Sabetta, W., Caponio, F., Blanco, A. (2007). Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 55:3857-3862.

Pehlivan, E., Arslan, G., Gode, F., Altun, T., Özcan, M. (2008). Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Grasas y Aceites*, 59(3), 239-244.

Pérez-Martínez P, García-Rios A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. (2010); Mediterranean Diet Rich in Olive Oil and Obesity, Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus; *Curr Pharm Des.*

Perez-Jimenez F., Alvarez de Cienfuegos G., Badimon L., Barja G., Battino M., Blanco A., Bonanome A., Colomer R., Corella-Piquer D., Covas I., Chamorro-Quiros J., Escrich E., Gaforio J. J., Garcia Luna P. P., Hidalgo L., Kafatos A., Kris-Etherton PM, Lairon D., Lamuela –Raventos R.; Lopez-Miranda J.; Lopez-Segura F.; Martinez-Gonzalez M. A.; Mata P.; Mataix J.; Ordovas J.; Oscada J.; Pacheco-Reyes R.; Perucho M.; Pineda-Priego M.; Quiles J. L.; Ramirez-Tortosa M. C.; Ruiz-Gutierrez V.; Sanchez-Rovira P.; Solfrizzi V.; Soriguer-Escofet F.; de la Torre-Fornell R.; Trichopoulos A.; Villalba-Montoro J. M.; Villar-Ortiz J. R.; Visioli F.; (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest.*

Perona, J. S., Cabello-Moruno, R., Ruiz-Gutierrez, V. (2006). "The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function". *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 429-445.

Portaria nº 246/2000, de 4 de Maio Decreto-Lei nº 62/2006 de 21/03/2006 no Diário da República nº 57 – I Série A. Acesso: <http://www.dre.pt/pdf1sdip/2006/03/057A00/20502053.PDF> (Acedido em 18/06/2013).

Recatalá, L., Micó, C., Peris, M., Sánchez, J., (2006). Assessing heavy metal sources in agricultural soils of a European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*, 65, 863-872.

Regulamento (CE) n.º 1107/96, de 12 de Junho de 1996 relativo a Denominação de Origem Protegida do Azeite Trás-os-Montes.

Reilly, C., (2002). Metal Contamination of Food: Its Significance for Food Quality and Human Health. *Blackwell Science*. 3ª edição.

Ribeiro, C.M (2005) Estabelecimento de uma rotina laboratorial para análise química de sedimentos e sua aplicação a sedimentos continentais do Minho (N.V.V Portugal): Contribuição para a reconstituição paleoambiental da região. Mestrado em Ciências do ambiente – Área de especialização em Qualidade Ambiental. Universidade do Minho.

Roca, A., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., López, M. C. (2000). Levels of calcium, magnesium, manganese, zinc, selenium and chromium in olive oils produced in Andalusia. *International Journal of Fats and Oils*, 6, 393-399.

Sahan, Y., Basoglu, F., Gücer, S. (2006). ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, CU, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. *Food Chemistry*, 105, 395-399.

Santana, G.P., 2008, *A toxicidade dos “metais pesados”* (consultado em: www.cq.ufam.edu.com/Artigos/Metais_Pesados, a 8/04/2013).

Samouco, R., 1998. Dicionário de Agronomia. Plátano – Edições Técnicas. Lisboa.

Sarikurkcu C., Copur M., Yildiz D. and Akata I. (2011), Metal concentration of wild edible mushrooms in Soguksu National Park in Turkey, *Food Chemistry*, 128, 731–734.

Silva, J., (2006). Biorremocão de nitrogénio, fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do efluente hidropónico, através do uso de *Chlorella vulgaris*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis.

Soares, M. E., Pereira, J. A., Bastos, M. L. (2006). Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3923-3928.

Sousa, C., Gouvinhas, I., Barreira, D., Carvalho, M. T., Vilela, A., Lopes, J., Martins-Lopes, P., Barros, A. “Cobrançosa” Olive Oil and Drupe: Chemical Composition at Two Ripening Stages. *J Am Oil Chem Soc* (2014) 91:599-611

Souza, R.M., Mathias, B.M., Silveira, C.L.P. & Aucelio, R.Q. (2005). Inductively coupled plasma optical emission spectrometry for trace multi-element determination in vegetable oils, margarine and butter after stabilization with propan-1-ol and water, *Spectrochimica Acta B*, 60,711–715.

Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., and Nychas, G. J. E. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology* 66, 3-11.

Tasdemir, Y., Kural, C., Cindoruk, S. S., Vardar, N. (2006). Assessment of trace element concentrations and their estimated dry deposition fluxes in an urban atmosphere. *Atmospheric Research*, 81, 17-35.

TCAF (2008) – Anses Table Ciquale Composition nutritionnelle des aliments 2008 (France).

TSE, (2003). TS 744 Table olives. Turkish local food standards ds. Ankara, Turkey, 16 p.

Tuck, K., Hayball, P., (2002). *Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. Nutritional Biochemistry* 13: 636–644.

Vavoulidou, E., Avramides, E. J., Papadopoulos, P., Dimirkou, A. (2004). Trace metals in different crop/cultivation systems in Greece. *Water, Air and Soil Pollution*, 4, 631-640.

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M. B., Seabra, M. J., Borges, Fernandes, P., Nunes, S., (2009). Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Direcção de Avaliação e Comunicação de Riscos. Lisboa. 329.

Vida Rural, edição número 1746, Abril 2009.

Yuan, C., Shi, J. B., He, B., Liu, J. F., Liang, L. N., Jiang, G. B. (2004). Speciation of Heavy Metals in Marine Sediments from the East China Sea by ICP-MS with Sequential Extraction. *Environmental International*; 30: 769-783..

Zeiner, M., Steffan, I., Cindric, I. J. (2005). Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: a pilot study on the geographical characterization. *Microchemical Journal*, 81, 171-176.

Zeiner, M., Juranovic- Cindric, I., Skevin, D. (2010). Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 1248-1252.

Ziena, H. M. S., Yousef, M. M., Aman, M. E. (1997). Quality attributes of the black olives as affected by different darkening methods. *Food Chemistry*, 60, 501-508.

Zohary, D., Hopf, M.,(2000). Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. 3rd ed. Oxford Univ. Press.