



***Avaliação do efeito da adição de extratos de algas (alga
Porphyra umbilicalis e alga Laminaria japónica) na
estabilidade de azeite aromatizado***

Ana Sofia Querido Faria

[2012]



Avaliação do efeito da adição de extratos de algas (alga *Porphyra umbilicalis* e alga *Laminaria japónica*) na estabilidade de azeite aromatizado

Ana Sofia Querido Faria

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora, Maria Manuel Gil e co-orientação do Professor Doutor, Rui Manuel Maneta Ganhão.

[2012]

*Título: Avaliação do efeito da adição de extratos de algas (alga *Porphyra umbilicalis* e alga *Laminaria japónica*) na estabilidade de azeite aromatizado*

Copyright © Ana Sofia Querido Faria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2012

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A conclusão do presente trabalho, não seria possível sem a ajuda e apoio de algumas pessoas que me acompanharam nas várias fases de elaboração da tese de mestrado. Desta forma quero agradecer:

- À minha orientadora, Professora Doutora, Maria Manuel Gil Figueiredo Leitão da Silva, pela bibliografia cedida, ensinamentos, disponibilidade, interesse e amizade com que me acompanhou ao longo do trabalho;
- Ao meu co-orientador, Professor Doutor, Rui Manuel Maneta Ganhão, pelos ensinamentos, disponibilidade, apoio, otimismo e amizade com que me acompanhou ao longo do trabalho;
- À professora Susana Mendes pelo seu apoio no tratamento estatístico dos resultados;
- Aos técnicos de laboratório que me apoiaram no que necessitei ao longo do tempo;
- A todos os colegas e amigos que me acompanharam e apoiaram;
- À minha colega Ana Raquel Ramos e Anabela Almeida por todo o apoio dado, pelas horas passadas nos laboratórios e por tudo o resto;
- E, finalmente, aos meus pais, irmão e namorado, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e grande amizade.

RESUMO

O azeite virgem representa um dos produtos alimentares mais importantes na dieta mediterrânea, sendo muito apreciado pelos consumidores devido às suas propriedades organoléticas, propriedades benéficas para a saúde (presença de antioxidantes naturais e composição em ácidos gordos monoinsaturados), qualidade nutricional e elevado tempo de vida útil.

Hoje em dia existe uma crescente procura por produtos inovadores, de elevada qualidade nutricional e período de conservação elevado, podendo destacar-se por exemplo os azeites aromatizados (gourmet).

Desta forma, o objetivo principal do presente trabalho foi a elaboração de dois novos produtos alimentares suplementados com extratos de algas, alga Nori (*Porphyra umbilicalis*) e alga Kombu (*Laminaria japónica*), criados a partir de azeite virgem extra aromatizado com alecrim, e avaliar o impacto da adição do extrato na estabilidade do azeite aromatizado.

Com vista a avaliar a estabilidade oxidativa dos novos produtos e o impacto da adição do extrato de algas ao azeite aromatizado, foram avaliados vários parâmetros químicos como acidez, índice de peróxidos, perfil lipídico, polifenóis totais, capacidade de redução do radical DPPH, espectrofotometria no UV, cor, densidade, viscosidade, clorofilas e carotenoides. As análises foram realizadas após produção e nos cinco meses seguintes (uma vez por mês). Os produtos foram também avaliados sensorialmente, três vezes ao longo de cinco meses de armazenamento (após produção, 3º mês e 5º mês).

De um modo geral, verificou-se uma tendência semelhante entre os azeites suplementados Kombu e Nori e o azeite Controlo, verificando-se também que a adição do extrato de algas ao azeite influenciou as suas características, no entanto não foram verificados resultados significativos nos azeites suplementados com extrato de algas em termos de acidez, índice de peróxidos e espectrofotometria no UV quando comparados com o azeite controlo. Em termos sensoriais, todos os azeites obtiveram uma aceitação favorável por parte do painel de provadores e pelos consumidores, sendo o azeite suplementado Nori o que apresenta melhores resultados em termos de preferência de aceitação.

Palavras-chave: Antioxidantes, azeite aromatizado, extrato de algas, alga Kombu, alga Nori.

ABSTRACT

Virgin olive oil is one of the most important components present in the Mediterranean diet, which is highly appreciated by consumers due to their organoleptic properties, beneficial properties for health (natural antioxidants and monounsaturated fatty acid composition), nutritional quality and high shelf life.

Today there is a growing demand for innovative products of high nutritional quality and high shelf-life and can stand out for example flavored olive oils (gourmet).

Thus, the objective of this study was the development of two new innovative food products supplemented with algae extracts, Nori seaweed (*Porphyra umbilicalis*.) and Kombu seaweed (*Laminaria japonica*) created from extra virgin olive oil flavored with rosemary and evaluating the impact of the addition of the extract in stability of flavored oil.

In order to evaluate the oxidative stability of the new products and the impact of adding the seaweed extract in the flavored olive oil, several chemical parameters such as acidity, peroxide index, lipid profile, polyphenols, capacity to reduce DPPH radical, spectrophotometry UV, color, density, viscosity, chlorophylls and carotenoids, were evaluated. Those chemical parameters were analyzed during five months of storage. Products were also sensorially evaluated three times over five months of storage (after production, 3rd month and 5rd month)

Generally, there was a similar tendency among oils supplemented Kombu and Nori and oil control. The addition of the algae extract influence the oil characteristics, however there was no significant results in the supplemented oil with seaweeds extract in terms of acidity, peroxide index and spectrophotometry UV compared to the oil control.

Sensorially, all the oils obtained a favorable acceptance by the panel of tasters and consumers, the supplemented Nori oil have the best results in terms of preference.

Keywords: Antioxidants, flavored olive oil, seaweed extract, seaweed Kombu, seaweed Nori.

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Azeite: composição química.....	2
1.1.1. Fração Maioritária.....	2
1.1.2. Fração Minoritária.....	3
1.2. Azeite: qualidade.....	4
1.2.1. Parâmetros Físico-químicos.....	5
1.2.2. Parâmetros Sensoriais.....	6
1.2.3. Fatores de deterioração do azeite.....	8
1.3. O azeite e a saúde.....	10
1.3.1. Dieta Mediterrânea.....	10
1.3.2. Efeitos benéficos do azeite.....	11
1.4. Inovação na indústria alimentar.....	12
1.4.1. Antioxidantes.....	12
1.4.2. Azeite Aromatizado.....	14
1.4.3. O uso de algas na indústria alimentar.....	14
2. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	16
2.1. Enquadramento.....	17
2.2. Objetivos.....	17
2.3. Desenho Experimental.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Material.....	21
3.1.1. Azeite.....	21
3.1.2. Algas.....	21
3.1.3. Reagentes.....	21
3.1.4. Equipamentos.....	21
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Caracterização química das algas.....	22
3.2.1.1. Humidade.....	22

3.2.1.2. Teor de Cinza	22
3.2.1.3. Teor de Gordura Total	23
3.2.1.4. Teor de Proteína Bruta	23
3.2.1.5. Teor de Fibra Bruta.....	24
3.2.2. Otimização da produção de extratos de algas.....	25
3.2.3. Suplementação do azeite aromatizado com extratos de algas	25
3.2.4. Avaliação da estabilidade química e sensorial das amostras.....	26
3.2.4.1. Acidez	26
3.2.4.2. Índice de Peróxidos	27
3.2.4.3. Análise espectrofotométrica no UV.....	27
3.2.4.4. Viscosidade e Densidade	28
3.2.4.5. Avaliação Instrumental da Cor.....	28
3.2.4.6. Quantificação de Carotenoides e Clorofilas.....	29
3.2.4.7. Polifenóis Totais	29
3.2.4.8. Avaliação da Capacidade de Redução do Radical DPPH.....	30
3.2.4.9. Perfil de Ácidos Gordos	30
3.2.4.10. Análise Sensorial.....	31
3.2.4.11. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Caracterização química das algas	35
4.2. Otimização da produção de extratos de algas	37
4.3. Avaliação da estabilidade química dos azeites aromatizados com alecrim suplementados com extrato de algas	40
4.3.1. Acidez	40
4.3.2. Índice de Peróxidos	42
4.3.3. Análise espectrofotométrica no UV.....	44
4.3.4. Viscosidade e Densidade	47
4.3.5. Cor	48
4.3.6. Quantificação de Carotenoides e Clorofilas.....	50
4.3.7. Polifenóis Totais	52
4.3.8. Capacidade de Redução do Radical DPPH	54
4.3.9. Perfil de Ácidos Gordos	56
4.3.10. Análise Sensorial	58
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.....	9
Figura 4.1 – Quantidade de Polifenóis Totais (QTP) para os extratos de algas	38
Figura 4.2 – Capacidade de redução do radical DPPH por parte dos extratos de algas ..	39
Figura 4.3 – Valores de acidez para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.....	41
Figura 4.4 - Valores do índice de peróxidos nos três azeites ao longo do tempo de armazenamento.....	42
Figura 4.5 - Valores de $K_{232}/k_{232\text{ inicial}}$ (a), $K_{270}/K_{270\text{ inicial}}$ (b) e $\Delta K/\Delta K_{\text{inicial}}$ (c) nos três azeites ao longo do tempo de armazenamento.....	45
Figura 4.6 - Valores de densidade (a) e viscosidade (b) para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.	47
Figura 4.7 - Parâmetros L^* (a), a^* (b) e b^* (c), para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.....	49
Figura 4.8 - Quantidade de clorofilas (a) e carotenoides (b) presentes nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.	51
Figura 4.9 - Quantidade de polifenóis nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.....	53
Figura 4.10 - Capacidade antioxidante nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.....	55
Figura 4.11 - Quantidade percentual de ácido palmítico (a) e do conjunto de ácidos gordos (b) nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.....	57
Figura 4.12 - Perfil Sensorial para as três amostras: (a) ao tempo inicial (após produção), (b) ao tempo intermedio (três meses) e (c) ao tempo final (cinco meses de armazenamento).....	58
Figura 4.13 - Perfil Sensorial nos três tempos de estudo para o azeites controlo (a), azeite Kombu (b) e azeite Nori (c).....	60
Figura 4.14 –Flavour residual para os três azeites ao longo do tempo de armazenamento.	61
Figura 4.15 – Evolução do nível de aceitabilidade (gosta/não gosta) para as três amostras em estudo nos três tempos de análise por parte do painel de provadores.	61
Figura 4.16 – Teste de consumidor realizado ao fim do tempo de armazenamento de forma a avaliar o grau de aceitabilidade geral (a) e preferência de cor (b) entre as três amostras.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição lípica do azeite.....	2
Tabela 1.2 – Composição em ácidos gordos de azeite.....	3
Tabela 4.1 – Critérios de escolha das algas a utilizar no estudo.	35
Tabela 4.2 – Caracterização química das algas.....	36
Tabela 4.3 – Variáveis e condições de produção do extrato de algas.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Azeite controlo

AK – Azeite Kombu

AN – Azeite Nori

COI - Conselho Oleícola Internacional

DOP – Denominação de origem protegida

DP – Desvio padrão

EAG – Equivalentes de ácido gálico

ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FST - Food Science and Technology

H• - Átomo de hidrogénio instável

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

IP - Índice de peróxidos

L• - Radical livre

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LH – ácidos gordos insaturados

LOO• - Radical peróxido

LOOH – Hidroperóxido

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

QTP – Quantidade de polifenóis totais

rpm – Rotações por minuto

SFA - Ácidos gordos saturados

UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Azeite: composição química

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2008), o azeite consiste no óleo obtido unicamente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), com exclusão dos óleos obtidos através do uso de solventes ou de processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza. O azeite é um alimento rico em ácidos gordos monoinsaturados que fornece 9 Kcal/g e é basicamente uma mistura de triacilgliceróis (compostos lipídicos formados por uma reação de esterificação de três ácidos gordos com uma molécula de glicerol), com alguns ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis e alguns constituintes não saponificáveis. O teor de ácidos gordos varia com o tipo de azeite e é um critério importante na qualidade do mesmo, sendo a sua principal composição em ácido oleico (Gunstone, 2002; Gutierrez, 2009). A sua composição é influenciada por fatores, como a variedade da azeitona, o estado de maturação, as condições edafoclimáticas e as diferentes tecnologias de produção (Gouveia, 1995; Gutierrez, 2009).

1.1.1. Fração Maioritária

A composição lipídica (fração saponificável, insolúvel em água) do azeite representa cerca de 98% a 99% do peso total do azeite e varia em gordura monoinsaturada, saturada e polinsaturada, sendo maioritariamente monoinsaturada, o que faz com que o azeite seja considerado um elemento nutritivo e essencial, como se observa pela tabela 1.1 (Gouveia, 1995; Gouveia *et al.*, 2002; Gutierrez, 2009).

Tabela 1.1 – Composição lípica do azeite (adaptado de Gutierrez, 2009).

	Gordura Monoinsaturada	53 a 87%
	Ácido oleico	63 a 83%
Composição Lipídica	Gordura Saturada	5 a 15%
	Gordura Polinsaturada	4 a 20%
	Família Ómega 6	3 a 14%
	Família Ómega 3	Até 1.5%

Em termos de perfil lipídico, os ácidos gordos (moléculas que apresentam na sua estrutura uma cadeia alquílica, saturada ou insaturada ligada a um grupo carboxílico (-COOH)), presentes em maiores quantidades nos azeites são o ácido oleico (C18:1), o ácido linoleico (C18:2) o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0) e o ácido palmitoléico (C16:1). Existem outros ácidos gordos presentes mas em quantidades inferiores aos ácidos referidos, como se pode ver pela tabela 1.2 (Gunstone, 2002).

Tabela 1.2 – Composição em ácidos gordos no azeite (adaptado de Gunstone, 2002).

Acido Gordo		Composição (%)
Láurico	12:0	Não detetado
Mirístico	14:0	0,0 – 0,1
Palmítico	16:0	7,5 – 20,0
Palmitoleico (ómega 9)	16:1	0,3 – 3,5
Heptadecanóico	17:0	0,0 – 0,5
8-heptadecaenóico	17:1	0,0 -0,6
Esteárico	18:0	0,5 – 5,0
Oleico (ómega 9)	18:1	55,0 – 83,0
Linoleico (ómega 6)	18:2	3,5 – 21,0
Linolênico (ómega 3)	18:3	0,0 – 1,5
Araquídico	20:0	0,0 – 0,8
Eicosenóico	20:1	Não detetado
Bénico	22:0	0,0 – 0,2
Lignocérico	24:0	0,0 – 1,0

A composição qualitativa em ácidos gordos nos azeites mantém-se constante, apenas varia a percentagem dos mesmos, devido a fatores como o local de produção, a latitude, o clima, a variedade e estágio de maturidade do fruto entre outros fatores (Gouveia, 1995). Nos azeites além dos triacilgliceróis (três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol), também estão presentes gliceróis parciais que têm como origem a biossíntese incompleta dos triacilgliceróis ou devido a reações hidrolíticas (Kiritsakis, 2000; Boskou, 1998).

1.1.2. Fração Minoritária

A fração insaponificável, solúvel em água, encontra-se em quantidades muito inferiores à fração saponificável, representando cerca de 2% da massa total do azeite.

Os azeites e a azeitona são uma fonte natural de antioxidantes, que inclui carotenoides, tocoferóis e compostos fenólicos, que através de diferentes mecanismos atuam de forma protetora contra espécies reativas de oxigénio, funcionando como captadores de radicais livres, pela doação rápida de um átomo de hidrogénio, sendo igualmente aceitador de iões metálicos como o ferro e o cobre, com capacidade de iniciarem a produção de radicais livres (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006; Rice-Evans *et al.*, 1997; Huang, 2008). De tal forma atuam como antioxidantes mas igualmente como

anti mutagênicos, impedindo a ocorrência de mutações de genes (Heinonen, 2007). O azeite é o óleo que possui maior quantidade em esqualeno (hidrato de carbono formado por 30 carbonos), o que proporciona uma ação benéfica sobre o sistema imunitário e na pele (Gouveia *et al.*, 2002).

Quando se avalia a qualidade de um azeite, os compostos fenólicos (como por exemplo os polifenóis ou os tocoferóis) devem de ser considerados nessa avaliação visto que a família destes compostos apresenta potencial antioxidante e contribuem significativamente para a estabilidade do azeite contra a oxidação, além de que são considerados compostos protetores contra o cancro, doenças do coração e atuam sobre o stress oxidativo (Boskou, 1998). Os compostos fenólicos estão também relacionados com as qualidades sensoriais e nutricionais do azeite (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006). Nos azeites, todos os tipos de tocoferóis estão presentes (α -tocoferol; γ -tocoferol; β -tocoferol e δ -tocoferol) no entanto o mais abundante é α - tocoferol que representa cerca de 95% do peso total de tocoferóis (Perrin, 1992). Outros compostos presentes no azeite são compostos aromáticos, que são responsáveis pelos sabores e odores dos azeites (Gouveia *et al.*, 2002). Estão também presentes os pigmentos de clorofilas e carotenoides que são pigmentos responsáveis pela cor do alimento (Boskou, 1998). A presença destes compostos depende do fruto, de fatores genéticos (como a variedade do fruto), do grau de maturação, de condições ambientais e do próprio processo de extração e armazenamento do óleo. Os pigmentos de clorofila são os responsáveis pela cor esverdeada do azeite virgem (Kiritsakis *et al.*, 2001). As clorofilas e os carotenoides têm um papel importante na atividade oxidativa de alimentos processados, uma vez que funcionam com atividade anti oxidativa no escuro e atividade pró-oxidante quando expostos à luz (Giuffrida *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 1998). Os carotenoides, juntamente com os polifenóis e tocoferóis fornecem uma estabilidade oxidativa ao azeite e têm um efeito sinérgico de antioxidantes e anti carcinogênicos. Além das clorofilas e carotenoides, existem outros pigmentos nos azeites virgens, como a luteína e beta-caroteno que são responsáveis pela cor amarelada dos azeites (Giuffrida *et al.*, 2007).

1.2. Azeite: qualidade

A qualidade de um azeite é afetada por uma série de fatores, como químicos, tecnológicos e sensoriais entre outros. A preservação da qualidade depende de condições adotadas antes e durante o armazenamento do produto (Ranalli, 1999). Para a determinação da qualidade do azeite, existe legislação específica que identifica

os parâmetros que devem ser analisados, como é o caso do índice de acidez, índice de peróxidos, análise espectrofotométrica no UV, perfil lipídico e análise sensorial, de forma a garantir ao consumidor final um produto de qualidade. Esses parâmetros são definidos em regulamentos Europeus (Regulamento (CEE) nº 2568/91 e posteriores alterações, o Regulamento (CE) N.º 1019/2002 ou Regulamento (CE) nº 865/2004) e no Conselho Oleícola Internacional. Existem no entanto outros parâmetros que, apesar de não estarem incluídos nos regulamentos e normas, possuem um efeito importante na estabilidade e características sensoriais do azeite e por isso são muitas vezes utilizados e determinados, como é o caso dos polifenóis, densidade, viscosidade e cor (Ayadi *et al.*, 2009; Kalua *et al.*, 2007).

1.2.1. Parâmetros Físico-químicos

- **Acidez**

A acidez de um azeite é consequência da rutura dos triacilgliceróis, devido a uma reação de hidrólise, com formação de ácidos gordos livres. Existem fatores que levam a um aumento da acidez do óleo, como por exemplo a infestação do fruto por insetos (moscas), atrasos na colheita do fruto e extração, frutos doentes devido a fungos, contacto prolongado entre água e óleo vegetal após extração e métodos de extração defeituosos (Kiritsakis, 1998). A medição da acidez é feita desta forma pela avaliação dos ácidos gordos livres, expressa em grama de ácido oleico por 100 grama de óleo, e apresenta como limite legal 2%, para azeites virgem, a partir do qual deixa de estar apto para consumo e tem de ser refinado (Granados, 2000).

- **Índice de Peróxidos**

O índice de peróxidos (IP) é frequentemente utilizado como indicador da qualidade de um azeite, visto que está relacionado com a oxidação inicial e formação de ranço e é medido em termos de miliequivalentes de oxigénio ativo por Kg de gordura (Gunstone, 2002). O limite legal para este parâmetro é de 20 meq O₂/Kg de azeite para azeites virgem extra segundo o Regulamento (CE) N.º 2568/91 e suas alterações.

- **Absorvância no ultra violeta**

A análise de azeite por espectrofotometria no ultravioleta fornece indicações sobre a qualidade de um azeite visto que deteta compostos oxidados anormais num azeite (Granados, 2000). A absorvância é medida a vários comprimentos de onda, a partir dos quais é possível determinar-se os coeficientes específicos. Os valores dos

coeficientes específicos K_{270} (270 nm), K_{232} (232 nm) e ΔK são utilizados para avaliar a autenticidade e a qualidade do azeite, quando estes valores são baixos estamos perante azeites de boa qualidade (Kiritsakis, 1992; Bouskou, 1998). Os hidroperóxidos conjugados absorvem a 232 nm, os produtos da oxidação secundária (aldeídos e cetonas), absorvem a comprimentos de onda de 262, 268, 270 e 274 nm. Os dienos e trienos conjugados (formados durante o processo de refinação) absorvem a 270 nm (Kiritsakis, 1992). Segundo o Regulamento (CE) N.º 702/2007, os azeites virgem extra apresentam limites de 2,5 para K_{232} , 0,22 para K_{270} e 0,01 para ΔK .

- **Cor**

O azeite é um produto natural, cuja cor depende apenas dos compostos biológicos presentes, como os pigmentos de clorofila e os carotenoides (Boskou, 1998). A presença de vários pigmentos depende de fatores como o modo de cultivo do fruto, o solo ou as condições climáticas e o processo de extração (Monguez Mosquera *et al.*, 1991). A cor do azeite no entanto pode variar com a luz, isto porque, a clorofila quando sujeita à presença de luz promove a formação de radicais de oxigénio e acelera a oxidação, no entanto no escuro, a clorofila age como antioxidante. O tipo de azeitona é outro fator que influencia a cor do azeite. Azeitonas verdes dão origem a um óleo verde devido ao alto conteúdo em clorofila. Azeitonas maduras dão origem a um óleo amarelo devido ao conteúdo em carotenoides. A combinação exata e as proporções de pigmentos determinam a cor final do óleo que pode variar desde um ouro de luz até a um verde rico (Kiritsakis, 1998)

1.2.2. Parâmetros Sensoriais

A qualidade sensorial de um alimento pode indicar o nível de aceitação, apreciação e nível de preferência do consumidor por um produto, e é determinada por um conjunto de características que são avaliadas mediante os órgãos sensoriais quando expostos a estímulos físicos, químicos e físico-químicos (Gutierrez, 2009). Os consumidores procuram e usam os atributos intrínsecos dos produtos para avaliar a qualidade dos mesmos, eles são os primeiros a olhar para as características sensoriais dos produtos alimentares, como cor, textura, viscosidade e cheiro (Dekhili *et al.*, 2011). No caso dos azeites, a avaliação sensorial é efetuada e justificada por:

- Estabelecer uma qualidade básica do produto para verificar a presença ou ausência e intensidade de defeitos sensoriais,
- Determinar a composição de um óleo de uma denominação de origem protegida (DOP),

- Revela mudanças nos perfis sensoriais em relação à origem geográfica, tecnologia e tempo de vida do produto,
- Encontrar comentários sobre as características sensoriais da preferência dos consumidores,
- Avaliar, em termos sensoriais, as diferenças de preferência entre clientes regulares e potenciais (Gutierrez, 2009).

Avaliação sensorial dos azeites virgens

O Azeite é o único produto com prova organolética obrigatória legalmente (Regulamento (CEE) N.º 2568/1991 e suas alterações). A avaliação das características organoléticas é definida por um painel de provadores treinado. As sensações apercebidas podem ser designadas por atributos ou atributos positivos quando são sensações agradáveis. Os atributos mais comuns num azeite são o frutado, o amargo e o picante e são conferidos pela variedade e pelo estado de maturação da azeitona. Porém, no caso de amadurecimento de frutas, mudanças biológicas, oxidação, contaminação ou armazenamento defeituoso podemos ter sensações desagradáveis que são denominadas por defeitos ou atributos negativos, sendo o mais comum a tulha, o ranço e o mofo (Fiorino, 1996; Gutierrez, 2009)

Atributos positivos (de acordo com o Regulamento (CE) N.º 640/2008):

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

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

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

Atributos negativos (de acordo com o Regulamento (CE) N.º 640/2008):

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

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

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

1.2.3. Fatores de deterioração do azeite

A oxidação lipídica é um dos principais meios de deterioração dos alimentos, e por isso, um desafio para a indústria e cientistas da área alimentar (Shahidi, 2005). Esta oxidação envolve reações de interação entre ácidos gordos insaturados e espécies reativas de oxigénio que leva a alterações na aparência, textura, tempo de vida útil, características nutricionais e organolépticas dos alimentos (Paraskevopoulou *et al.*, 2006; Shahidi, 2005). Os lípidos são suscetíveis à oxidação quando na presença de (Shahidi, 2005; Villalta, 1999):

- Luz - Favorece a reação do azeite com o oxigénio;
- Temperatura – Temperaturas elevadas (superiores a 20°C) favorecem a formação de peróxidos e posterior decomposição em aldeídos e cetonas;
- Oxigénio - O contato do azeite com o oxigénio é uma das causas de oxidação do mesmo. Quanto mais tempo o azeite estiver em contato com o oxigénio maior será o processo de degradação. Processos como, agitação, trasfegas ou o próprio enchimento do depósito influenciam a oxidação do azeite;
- Metais – Os metais produzem um efeito catalisador da auto-oxidação e rancificação do azeite, podendo até conceder um sabor metálico ao azeite;
- Enzimas.

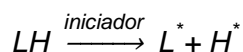
Os peróxidos são os produtos primários da oxidação do azeite. Os óleos e gorduras como o azeite sofrem um processo de oxidação quando sujeitos à presença de

oxigénio, levando à formação de produtos com um sabor e odor desagradável que pode por em causa as propriedades nutricionais e sensoriais do azeite. Quando estas reações ocorrem, ácidos gordos essenciais são destruídos (ácido linoléico e linolênico), bem como algumas vitaminas lipossolúveis. Os ácidos gordos podem ser oxidados por um dos seguintes mecanismos (Kiritsakis, 1992; Shahidi, 2005; Laguerre *et al.*, 2007):

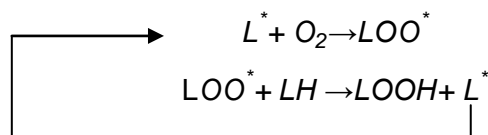
- **Auto-oxidação:**

O processo de auto-oxidação ocorre por espécies reativas de oxigénio ou os chamados radicais livres. Este processo está temporariamente inibido pelos antioxidantes naturais do óleo que têm a capacidade de absorver esses radicais livres (Kiritsakis, 1998). Os ácidos gordos saturados são usualmente os ácidos afetados por estas reações quando se apresentam como ácidos gordos livres ou triglicérides (Shahidi, 2005). No que diz respeito aos ácidos gordos insaturados, o processo ocorre através de uma reação em cadeia de radicais livres, que ocorre em três etapas (figura 1.1): iniciação, propagação e terminação, como apresentado de seguida (Kiritsakis, 1987; Frankel, 1998).

Iniciação:



Propagação



Terminação

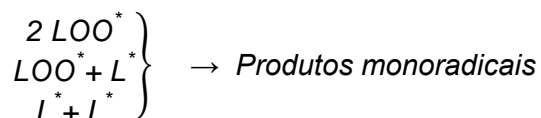


Figura 1.1 – Processo de auto-oxidação de ácidos gordos insaturados.

A etapa de iniciação surge quando os ácidos gordos insaturados (LH) perdem um átomo de hidrogénio instável (H•), originando radicais livres (L•). Esta etapa é catalisada pela presença de metais, aquecimento ou luz (Kochhar, 1993).

Na etapa de propagação, os radicais livres dos ácidos gordos (L•) reagem com o oxigénio molecular formando radicais peróxidos (LOO•). Estes, por sua vez, reagem

com novos ácidos gordos insaturados para produzir hidroperóxidos (LOOH) de natureza instável e outros radicais livres, desencadeando o mecanismo de propagação. Esta cadeia de reações prossegue até se esgotarem os ácidos gordos insaturados ou até os radicais livres se inativarem uns aos outros (Kiritsakis, 1987).

A última etapa consiste na etapa de terminação, em que se formam produtos monoradicaís, estáveis, nomeadamente os produtos de oxidação secundária., responsáveis pelo aparecimento de odores e sabores desagradáveis, ranço e cor amarelada (Kiritsakis, 1987).

- **Foto-oxidação**

A foto-oxidação ocorre quando o óleo está exposto a fontes de luz natural e/ou artificial (incluindo lâmpadas alógenas e luzes das zonas comerciais). A foto-oxidação provoca uma grave deteriorização no azeite, tornando-o mais amarelo e pode ocorrer até 30.000 vezes mais rápido do que a oxidação (Kiritsakis, 1998).

- **Lipólise**

A lipólise ocorre nas células vegetais durante o processo de pós colheita, processamento e armazenamento de alimentos. A hidrólise dos lípidos é realizada principalmente por enzimas lipolíticas (lípases) que hidrolisam os triacilgliceróis, sendo responsáveis pelo aumento da acidez do azeite (Kiritsakis, 1992).

- **Oxidação enzimática**

Nos azeites virgens, a oxidação enzimática é responsável pelo aparecimento de off-flavours, no entanto também pode ser responsável pela formação de compostos de flavour desejado. As enzimas presentes no azeite podem provocar a oxidação dos ácidos gordos insaturados. As principais enzimas que estão envolvidas são principalmente as enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase (Morales e Prybylski, 2000).

1.3. O azeite e a saúde

1.3.1. Dieta Mediterrânea

Os alimentos fornecem nutrientes essenciais e desempenham um vínculo cultural entre a sociedade e os seres humanos, uma vez que as condições socioeconómicas, a localização geográfica e a religião influenciam de forma direta as preferências dos

consumidores (Willett *et al.*, 1995). Os habitantes da Europa do Sul e Norte de África têm uma alimentação que se baseia na Dieta Mediterrânea (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 (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006). Nos últimos anos, este interesse pelo azeite tem sido alargado aos países do Norte da Europa e Estados Unidos (Boskou, 2007). Esta dieta é rica em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e baixa em ácidos gordos saturados (SFA), contribuindo beneficemente para a saúde do ser humano (Huang, 2008; Willett *et al.*, 1995).

1.3.2. Efeitos benéficos do azeite

Nos últimos anos o número de casos reportados sobre as propriedades benéficas do azeite tem aumentado. Na Grécia, Itália e Espanha os casos de cancro do cólon e próstata, bem como doenças coronárias tem diminuído, e supõe-se que esta diminuição esteja relacionada com o fato de estes povos possuírem uma alimentação que tem como base a dieta mediterrânea, que apresenta como principal fonte de gordura o azeite (Tuck, 2002). Os benefícios que advém do consumo de azeite estão relacionados com a sua composição química, nomeadamente com o seu teor em ácidos gordos, em particular pela elevada percentagem de ácido oleico e também pela presença de compostos com atividade antioxidante, compostos fenólicos e tocoferóis (Gunstone, 2002; Gouveia *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Kris Etherton (1999) e Trautwein *et al* (1999) relatam que os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) em configuração geométrica *cis* (a cadeia alquílica insaturada apresenta-se na forma *cis*) presentes na dieta possuem um efeito superior contra a aterosclerose do que os ácidos gordos saturados (SFA), sendo comparáveis aos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na prevenção do risco de doenças cardiovasculares. O ácido oleico, principal ácido gordo monoinsaturado do azeite, contribui para a diminuição do LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e para a estabilidade ou inclusive para o aumento da HDL (lipoproteínas de alta densidade) (Granados, 2000; Duarte, 2003). As LDL são menos suscetíveis à oxidação por radicais livres numa dieta rica em MUFA, isto porque os MUFA são mais estáveis e resistentes à oxidação que os PUFA. Os MUFA, em particular o ácido oleico está correlacionado com baixos níveis de LDL e níveis elevados de HDL no plasma, a elevada composição em MUFA está também relacionada com a diminuição dos fatores de risco das doenças coronária (Huang, 2008; Covas, 2007).

A fração minoritária da constituição do azeite tem um papel substancial na proteção do sistema cardiovascular. Esta fração insaponificável é rica em hidrocarbonetos, esterés, tocoferóis, flavonoides, esteróis, polifenóis e entre outros. Os polifenóis interferem com a cadeia de reações iniciada por radicais livres. Estudos epidemiológicos têm mostrado que os compostos fenólicos facultam uma considerável proteção contra o cancro (pele, peito e cólon), doenças coronárias, e agem contra o stress oxidativo das células (Huang, 2008; Rice-Evans *et al.*, 1997; Heinonen, 2007). O azeite também apresenta propriedades benéficas relativamente ao aparelho digestivo (March & Ríos, 1989). O azeite inibe parcialmente a motilidade gástrica, levando a que o conteúdo gástrico do estomago seja libertado mais lentamente e gradualmente para o duodeno, dando uma maior sensação de “plenitude” e favorecendo a digestão e absorção de nutrientes no intestino (<http://www.internationaloliveoil.org>).

1.4. Inovação na indústria alimentar

Durante as últimas décadas a sociedade viu-se com transformações nas suas condições económicas, demográficas e socioculturais, bem como o crescimento de segmentos populacionais e variação dos hábitos alimentares, que levou a que atualmente os consumidores prefiram alimentos diferenciados, sendo essa compra motivada por fatores económicos, atitudes, preferências ou perceções (Samir, 2002). Os produtos com gordura têm sido uma fonte de interesse no desenvolvimento, processamento e controlo de qualidade por parte das empresas (O’Brian, 2009). No que diz respeito ao azeite, as indústrias têm vindo a apostar no desenvolvimento de azeites com ervas aromáticas de forma a aumentar o valor nutricional do produto e acompanhar ao mesmo tempo as tendências e desenvolvimento de novos produtos alimentares. Os antioxidantes têm vindo a ser nos últimos tempos alvo de estudos, devido a interferirem de forma benéfica nas reações oxidativas, retardando-as e aumentando a estabilidade dos óleos e gorduras (Baiano *et al.*, 2010)

1.4.1. Antioxidantes

O uso de antioxidantes na indústria alimentar e os seus mecanismos funcionais têm vindo a ser amplamente estudados ao longo dos anos. Os antioxidantes são compostos, formados por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos fenólicos e ainda enzimas, que retardam e/ou impedem as reações de oxidação pelo bloqueio dos radicais livres pela doação de eletrões de hidrogénio. Nos alimentos, os antioxidantes são moléculas que protegem macromoléculas, neutralizando o processo

de oxidação, através da proteção dos lípidos do contato com precursores do processo oxidativo, e atuando como agentes que previnem a oxidação, suspendendo a etapa de propagação da auto-oxidação (Lidon, 2007). Os antioxidantes podem ser classificados como (Ramalho, 2006):

- Primários – são os compostos fenólicos que ajudam na remoção ou inativação dos radicais livres resultantes das fases de iniciação e propagação do processo de oxidação, pela doação de átomos de hidrogénio, interrompendo o processo de oxidação e levando à formação dos radicais inertes.
- Sinergistas – são utilizados para incrementar a atividade dos antioxidantes primários quando combinados adequadamente.
- Supressores de oxigénio – sequestram o oxigénio presente no meio, tornando o meio inapropriado para o processo de auto-oxidação.
- Biológicos – são enzimas (como as catalases ou a glutathione peróxidase) que conseguem remover o peróxido de hidrogénio.
- Agentes quelantes – complexam iões metálicos (como ferro e cobre), que catalisam a oxidação lipídica.
- Antioxidantes mistos – compostos derivados de plantas e animais.

Os antioxidantes podem ainda ser sintéticos ou naturais, ambos utilizados na indústria alimentar como aditivos. Os antioxidantes sintéticos são utilizados em produtos alimentares submetidos a processamento térmico e na prevenção da oxidação de óleos e gorduras. No entanto nas últimas décadas, o seu uso têm vindo a ser ultrapassados pelos antioxidantes naturais, visto que existem estudos que indicam um efeito de toxicidade na saúde do consumidor, como, o risco acrescido de alergias, aumento dos níveis de colesterol ou a acumulação de tecidos adiposos, e por isso, não são permitidos na produção de alimentos para crianças e bebés (Lidon, 2007). Os antioxidantes naturais de origem vegetal têm substituído os antioxidantes sintéticos. Estes são isolados a partir de frutos, plantas aromáticas, algas entre outros, e os consumidores tendem a aceitar mais facilmente estes devido ao baixo risco de toxicidade (fazem parte da composição de inúmeros alimentos), no entanto são mais caros, necessitam de ser purificados, podem conferir aroma, sabor ou cor desagradável ao produto (Lidon, 2007; Nollet, 2010). No entanto uma grande variedade de frutos e extratos fenólicos têm sido relacionados com o aumento da estabilidade oxidativa em alimentos de origem vegetal e animal, com particular destaque para os frutos silvestres e ervas aromáticas como melhores fontes de compostos fenólicos (Heinonen, 2007; Estévez *et al.*, 2007).

Os antioxidantes ao prevenirem e impedirem a oxidação aumentam a estabilidade do alimento, contribuindo para um aumento do tempo de validade do mesmo. No caso de óleos e gorduras, que possuem elevado conteúdo lipídico, o antioxidante natural mais utilizado é o tocoferol, no entanto outros podem ser utilizados, como os antioxidantes extraídos das algas marinhas comestíveis (Ramalho, 2006).

1.4.2. Azeite Aromatizado

O azeite é um produto amplamente utilizado na cozinha mediterrânea e alvo de vários estudos. Hoje em dia, é possível comprar-se azeites com aditivos, nomeadamente aromatizados que têm como objetivo melhorar as propriedades sensoriais dos azeites, como também as propriedades nutricionais e prolongamento do tempo de vida útil. Os compostos adicionados são dotados de propriedades benéficas para a saúde, como o elevado teor em óleos essenciais e outros compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianos. Os azeites aromatizados têm um aumento do tempo de vida útil relativamente aos azeites virgens. Os antioxidantes presentes em maior quantidade evitam a oxidação do azeite e conseqüente alteração de sabor, preservando-se o azeite num período superior de tempo, além que preserva a qualidade nutricional do por um período superior de tempo, visto que a oxidação lipídica ocorre mais tarde (Baiano *et al.*, 2010). De entre os produtos a utilizar encontram-se entre outros:

- Hortaliças: alho, cebola, pimenta, pimentão, tomate seco,
- Ervas: alecrim, orégãos, manjeriço, tomilho, funcho,
- Frutas: limão, laranja, tangerina, maçã, banana,
- Frutos secos: amêndoa, avelã, noz,
- Aromas: óleos aromatizados com baunilha por exemplo (Baiano *et al.*, 2010).

1.4.3. O uso de algas na indústria alimentar

O uso de algas como alimento remonta desde o século IV no Japão e na China. Hoje, estes dois países juntamente com a República da Coreia são os maiores consumidores de algas na forma de alimento. No entanto, verifica-se um aumento da procura de algas para a alimentação ao longo dos últimos cinquenta anos um pouco por todo o mundo (McHugh, 2003). As algas apresentam na sua constituição uma série de compostos bioativos (como polifenóis, clorofilas, carotenóides e tocoferóis) com potencial benéfico para a saúde e, portanto, o uso como ingrediente funcional abre novos horizontes para a indústria e processamento alimentar. As algas comestíveis contêm aceitáveis níveis de proteínas e a sua composição em

aminoácidos é de grande interesse nutricional. A fração lipídica das algas apresenta uma proporção elevada em ácidos gordos essenciais, particularmente em ácidos gordos polinsaturados e são também uma fonte de minerais, como cálcio, sódio, magnésio, potássio, iodo, ferro e zinco e são consideradas uma fonte de fibra alimentar, visto que os seus componentes principais são polissacarídeos não digestíveis (López-Lopez *et al.*, 2009). As algas possuem atividade antioxidante devido ao seu conteúdo em carotenoides, compostos fenólicos, alfa-tocoferol, flavenoides entre outros com componentes antioxidantes. Neste sentido nos últimos anos tem sido consideradas como aditivos alimentares, não só como gelificantes e espessantes mas também na qualidade de antioxidantes naturais, prevenindo a oxidação dos alimentos, preservando a qualidade e aumentando o tempo de validade dos mesmos (Wang, 2011). Os compostos antioxidantes das algas atuam contra uma série de doenças, apresentando potencial anti-inflamatório, antibacteriano ou antifúngico (Cornish, 2010; Zubia *et al.*, 2007). São inúmeras as espécies de algas utilizadas correntemente na alimentação e indústria alimentar, encontrando-se entre as mais utilizadas a alga *Porphyra umbilicalis* (Nori) e a alga *Laminaria japonica* (Kombu).

A Nori é uma alga fina, de lâmina plana e avermelhada que é encontrada em zonas temperadas (Oohusa, 1993). Esta alga encontra-se entre as algas mais nutritivas apresentando cerca de 30-50% de proteínas. O teor de hidratos de carbono é relativamente baixo (0,1%) e apresenta alto valor vitamínico, com quantidades significativas de vitamina A, C, B3 e B9. O sabor característico desta alga deve-se às grandes quantidades de três aminoácidos presentes: alanina, ácido glutâmico e glicina (Nisizawa *et al.*, 1987; McHugh, 2003).

A alga Kombu é uma alga que deriva de uma mistura de espécies de *Laminaria*, que incluem a *L. longissima*, *L. japonica*, *L. angustata*, *L. coriacea* e *L. ochotensis*. Esta cresce naturalmente na República da Coreia, em águas calmas e com temperaturas entre os 3° e 20°C. Esta alga contém cerca de 10% de proteínas, 2% de gordura e quantidades consideráveis de vitaminas e minerais, embora geralmente em quantidades inferiores às encontradas na alga Nori, no entanto contem iodo, que existe em poucas quantidades na alga Nori e outras algas vermelhas (Nisizawa *et al.*, 1987; Tseng, 1987; McHugh, 2003).

2. ENQUADRAMENTO, OBJETIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL

2.1. Enquadramento

A indústria alimentar é uma área que se encontra em constante desenvolvimento, que combina a inovação tecnológica com a inovação cultural e social (Earle, 1997).

A procura dos consumidores por produtos gourmet pode aumentar a utilização e procura por azeites não tradicionais (por exemplo com adição de certas ervas aromáticas), ao mesmo tempo que aumenta o valor deste produto alimentar (Antoun, 1997).

O aumento do período de validade dos produtos alimentares contribui para uma satisfação dos consumidores, um aspeto muito importante para as empresas do setor. Existem várias tecnologias utilizadas para o efeito, no caso de óleos e gorduras, para que a qualidade não seja afetada e alterada negativamente devido a reações de oxidação lipídica, podem ser adicionados produtos/compostos antioxidantes, que promovem uma maior estabilidade oxidativa e um alargamento do tempo de vida útil dos mesmos (Fuller, 2005).

As algas são um dos produtos que podem ser adicionados a diversos alimentos de forma a aumentar a validade ao mesmo tempo que possuem alto valor nutritivo, com atividade antioxidante e com benefícios para a saúde, sendo consumidas desde a antiguidade e hoje um pouco por toda a população mundial (McHugh, 2007)

2.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de extratos de algas, (alga *Porphyra umbilicalis* e alga *Laminaria japónica*) na estabilidade de azeite aromatizado.

Para alcançar este objetivo, seguiu-se os seguintes objetivos parciais:

- Caracterização química das algas;
- Otimizar a produção de extratos de algas com seleção do melhor solvente (etanol, água, azeite aromatizado);
- Suplementação do azeite aromatizado com os extratos de algas;
- Avaliação da estabilidade química e sensorial dos azeites ao longo dos 5 meses de armazenamento.

2.3. Desenho Experimental

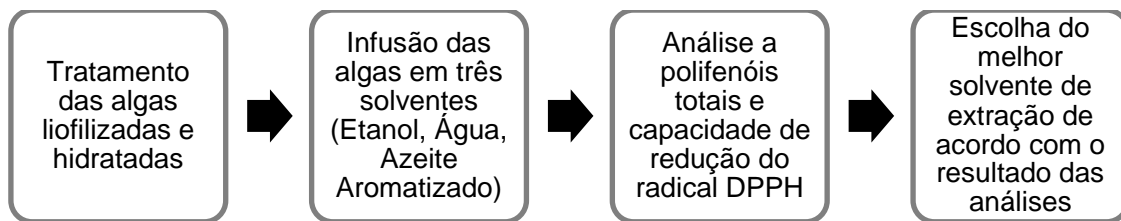
1ª Fase – Caracterização química das algas utilizadas no estudo.

Foram realizadas análises aos seguintes parâmetros:

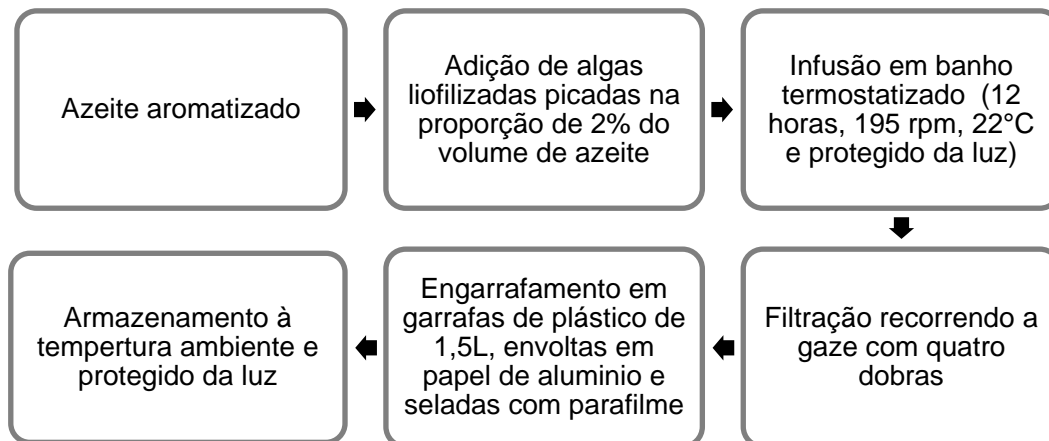
- Humidade
- Teor de Cinza
- Teor de Gordura total
- Teor de Próteína Bruta
- Teor de Fibra Bruta

As análises foram realizadas uma vez, após produção

2ª Fase – Otimização da produção de extratos de algas:



3ª Fase – Suplementação do azeite aromatizado com os extratos de algas.



4ª Fase – Avaliação da estabilidade química ao longo do tempo de armazenamento (cinco meses).

Os novos produtos (azeites aromatizados suplementados com o extrato de algas) e o produto controlo (azeite aromatizado) foram alvo das seguintes análises químicas:

- Acidéz
- Índice de peróxidos
- Análise espectrofotométrica no UV
- Viscosidade e densidade
- Cor
- Perfil lípidico
- Carotenóides e clorofilas
- Polifenóis totais
- Avaliação da Capacidade de Redução do Radical DPPH

Análises realizadas durante cinco meses, com intervalos de um mês (t_0 (após produção), t_1 , t_2 , t_3 , t_4 e t_5 (tempo final))

5ª Fase – Avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenamento.

As amostras em estudo foram avaliadas sensorialmente por um painel de 10 provadores semi-treinado três vezes ao longo do tempo (após produção (t_0), tempo intermédio (t_3 – 3 meses) e tempo final (t_5 – 5 meses)). No tempo final (t_5), as amostras foram ainda avaliadas por um painel de 105 consumidores de forma a avaliar-se a aceitação dos novos produtos no mercado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Azeite

O azeite virgem extra aromatizado com alecrim utilizado neste estudo foi produzido na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM) de acordo com uma metodologia desenvolvida num projeto com a empresa 9º Sentido, Lda.

3.1.2. Algas

As algas selecionadas foram a alga Nori (*Porphyra umbilicalis*) e a alga Kombu (*Laminaria japónica*), isto porque, se encontram disponíveis no mercado, são das algas mais utilizadas em preparações alimentares e segundo Ismail (2002) estas apresentam níveis elevados de atividade antioxidante, cerca de 50%-57%. As duas algas foram adquiridas na forma liofilizada, embaladas em vácuo, capturadas no oceano atlântico e fornecidas pela empresa ALGAMAR (Espanha).

3.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados no presente trabalho para as várias análises laboratoriais possuíam grau de pureza p.a. e foram obtidos de diversas fontes: Acros Organics, Bélgica; Fluka Biochemika, Suíça; Himedia, Índia; Labscan, Polónia; Merck, Alemanha; Panreac, Espanha; Scharlau, Espanha e Sigma-Aldrich, EUA.

3.1.4. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram:

- Balança de precisão $\pm 0,0001$ g BL 120S, da Sartorius;
- Banho termostático, Julabo SW22;
- Colorímetro Chroma Meter CR-400/410, da KONICA MINOLTA;
- Cromatografo Gasoso Capilar, Finnigan TRACE GC Ultra, equipado com injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation e munido de uma coluna Trace TR-FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de filme;
- Densímetro na gama 0,900 g/ml – 1,000 g/ml; Ludwig Schneider;
- Destilador Foss Kjeltac 2100;
- Digestor 2006 Foss;
- Espectrofotómetro Thermo Helios α ;

- Estufa de secagem, WTB Binder 7200, Tmax=300oC;
- Evaporador Rotativo de Vacuo Laborota 4000, da Heidolph;
- Manta de aquecimento, da Selecta; Mufla Controller B170, da Nabertherm;
- Placas de agitação magnética e aquecimento, da VELPR Científica;
- Ultrasons, da VWR;
- Viscosímetro viscotester 7 plus, da HAAKE;
- Vórtex, Velp Científica.

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização química das algas

A caracterização química das algas foi determinada pela análise a cinco parâmetros: humidade, teor de cinza, teor de gordura total, teor de proteína bruta e teor de fibra bruta. Todas as análises foram efetuadas em triplicado.

3.2.1.1. Humidade

O teor de humidade foi determinado segundo o método descrito em AOAC, 2000. Este procedimento consiste em pesar cerca de 3 g de amostra para um cadinho (previamente seco a 105°C durante 3 horas e colocado em exsicador durante 10 minutos) e a sua colocação em estufa a 105° C por 3 horas. Após este período colocar a amostra no exsicador até arrefecer e proceder à pesagem. Repetir o passo de secagem até a amostra atingir peso constante. Após peso constante, a humidade da amostra é determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (1)$$

Onde: M_1 - massa (g) do cadinho com amostra; M_2 - massa (g) do cadinho com amostra depois de seca.

3.2.1.2. Teor de Cinza

O teor de cinza foi determinado segundo o método adaptado da NP 2032/1988 para determinação do teor de cinza em pescado. Este procedimento consiste em pesar $5 \pm 0,001$ g de amostra para um cadinho. Posteriormente, as amostras são secas em

estufa a aproximadamente 105°C durante uma noite, com colocação de seguida na mufla durante 4 horas a 500°C. De seguida colocar no exsicador e pesar. Repetir a operação de inceneração e arrefecimento em exsicador até verificação de peso constante. O teor de cinza é determinado recorrendo à seguinte equação:

$$\% \text{ Cinza} = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100 \quad (2)$$

Onde: M_1 - massa (g) do cadinho; M_2 - massa (g) do cadinho com amostra; M_3 - massa (g) do cadinho com amostra depois de seca.

3.2.1.3. Teor de Gordura Total

O teor de gordura total foi determinado segundo o método adaptado de Bligh & Dyer (1959). O método consiste em colocar num gobelé 4 g de amostra picada finamente em 7 ml de clorofórmio e 14 ml de metanol sob agitação constante durante 10 minutos a temperatura de 50°C. De seguida é adicionado 5 ml água miliQ e 5 ml de clorofórmio permanecendo sob agitação constante por mais 10 minutos à mesma temperatura. As amostras são depois colocadas durante 15 minutos num aparelho de ultra-sons e filtradas a vácuo (filtro n.º 1). O filtrado é colocado numa ampola de decantação e após separação de fases, a fase inferior que contém a gordura é decantada para um balão periforme (previamente pesada) através de uma coluna de sulfato de sódio anidro para retirar possíveis vestígios de água. Por último, o solvente é colocado a evaporar num evaporador rotativo durante 20 minutos, a 90 rpm e a 45°C. Após evaporação, o teor de gordura total é determinado pela seguinte equação:

$$\text{Teor gordura total (gr gordura/gr amostra)} = \frac{M_3 - M_2}{M_1} \quad (3)$$

Onde: M_1 - massa (g) de amostra; M_2 - massa (g) do balão periforme; M_3 - massa (g) do balão periforme depois do solvente evaporado.

3.2.1.4. Teor de Proteína Bruta

A quantificação do teor de proteína bruta foi realizada pelo método de Kjeldahl, segundo a NP 4488:2009 para determinação do teor de azoto total nos produtos da pesca e da aquicultura. Este método consiste em colocar 0,5±0,001 g de amostra num

tubo de Kjeldahl e adicionar duas pastilhas de catalisador Kjeldahl e 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (min 98%), colocando-se de seguida o tubo no digestor deixando digerir a solução a 380°C até que a mesma se apresente esverdeada (cerca de 1h20). Deixa-se arrefecer os tubos e coloca-se os mesmos no digestor e ajusta-se o equipamento para que o volume a adicionar de uma solução de hidróxido de sódio (40% (m/v)) seja de 50 ml. Procede-se à destilação durante 6 minutos com receção num erlenmeyer com 20 ml de uma solução de ácido bórico (40% (m/v)) e umas gotas de indicador (vermelho de metilo e verde de bromocresol). O destilado obtido é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico (0,1N). É efetuado um ensaio em branco, seguindo a mesma técnica, substituindo-se a amostra por aproximadamente 1gr de sacarose. O volume de titulante gasto na amostra e no branco é utilizado para a determinação do teor de azoto total. O teor de proteína bruta é calculado multiplicando o teor de azoto total por um fator convencional de 6,25.

$$\text{Teor de azoto total (\%)} = \frac{14 \times (V_a - V_b) \times N}{m/1000} \times 100$$

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \text{Teor de azoto total (\%)} \times 6,25 \quad (4)$$

Onde: V_a - volume (ml) da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra; V_b - volume (ml) da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco; N - concentração (N) da solução de ácido clorídrico; m - massa (g) da toma para análise.

3.2.1.5. Teor de Fibra Bruta

A quantificação da fibra bruta foi realizada segundo o método descrito em AOAC, 2000. Este método consiste na digestão de 1 g de amostra moída (previamente desengordurada e seca) em 150 ml de ácido sulfúrico 1,25% por 30 minutos, seguindo-se a filtração da amostra a vácuo e lavagem com água destilada em ebulição. De seguida o resíduo é colocado numa digestão em meio alcalino com 150 ml de hidróxido de sódio 1,25% durante 30 minutos seguindo-se a filtração a vácuo e lavagem com água destilada em ebulição. Após estes tratamentos, a amostra é colocada em estufa a 100°C durante uma noite e colocada em exsiccador até arrefecer (pesar a amostra). De seguida, a amostra é colocada na mufla durante 2 horas a 550°C, e colocadas em exsiccador até arrefecer (pesar novamente). O teor de fibra bruta é determinado pela equação:

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \frac{M_2 - M_3}{M_1} \times 100 \quad (5)$$

Onde: M_1 - massa (g) de amostra; M_2 - massa (g) de amostra seca em estufa; M_3 - massa (g) incinerada.

3.2.2. Otimização da produção de extratos de algas

A preparação dos extratos de algas foi efetuada de acordo com o método adaptado do trabalho de Pinteus, 2011. Para a otimização da produção dos extratos foi utilizado a alga Kombu (*Laminaria japonica*) na forma liofilizada e na forma hidratada e três solventes, em separado. Ambas as algas (liofilizadas e hidratadas) foram trituradas finamente (1 g) para um gobelé, e foi adicionado 15 ml de um solvente (água, etanol ou azeite aromatizado). A solução foi colocada sob agitação (em placa de agitação e banho termostaticado) constante durante 12 horas e à temperatura ambiente, sendo posteriormente filtrada, com filtro n.º4. A capacidade antioxidante dos extratos obtidos (para posterior seleção do solvente a utilizar e da forma de apresentação da alga) foi avaliada pela Quantificação Total de Polifenóis (QTP) pelo método de Folin Ciocalteu (ver ponto 3.2.4.7) e pela capacidade redução do Radical DPPH (ver ponto 3.2.4.8).

3.2.3. Suplementação do azeite aromatizado com extratos de algas

O azeite aromatizado com alecrim foi dividido em 3 grupos:

- i. Controlo (AC) – azeite sem adição de extrato de algas, submetido a agitação constante durante 12 horas à temperatura ambiente (22°C);
- ii. Azeite Nori (AN) – azeite aromatizado com alecrim suplementado com extrato de alga Nori (de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.2.2 e com os resultados obtidos no processo de otimização da extração das algas),
- iii. Azeite Kombu (AK) – azeite aromatizado com alecrim suplementado com extrato de alga Kombu (de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.2.2 e com os resultados obtidos no processo de otimização da extração das algas).

As algas foram adicionadas numa concentração de 2% de algas por volume de azeite. Posteriormente, os azeites foram embalados em garrafas de plástico de 1,5L, envoltas em papel de alumínio e seladas com parafilme. De seguida, foram armazenadas em local protegido da luz e à temperatura ambiente.

Os três azeites foram submetidos a análises de estabilidade oxidativa uma vez por mês, por um período de cinco meses, tendo como data de início a data de produção (tempo 0). A análise sensorial foi realizada três vezes ao longo do tempo de armazenamento (tempo inicial (t_0), terceiro mês (t_3) e quinto mês (t_5)). Para cada análise foi aberta uma garrafa que estava totalmente selada. Todas as análises químicas foram realizadas em triplicado e as provas de análise sensorial foram realizadas em duplicado.

3.2.4. Avaliação da estabilidade química e sensorial das amostras

Para a avaliação da estabilidade química e sensorial das amostras foram avaliados os seguintes parâmetros: acidez, índice de peróxidos, análise espectrofotométrica no UV, viscosidade e densidade, avaliação instrumental da cor, quantificação de carotenoides e clorofila, polifenóis totais, capacidade de redução do radical DPPH, perfil lípido e análise sensorial. É de referir que o azeite virgem extra utilizado como base para a preparação do azeite aromatizado foi também analisado, no entanto apenas uma vez e após produção das amostras (resultados em anexo II, tabela 7.2).

3.2.4.1. Acidez

A acidez foi determinada pelo método descrito no anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 e nas posteriores alterações indicadas no Regulamento (CE) nº 702/2007 e é expressa em percentagem de ácido oleico. A determinação da acidez consiste na dissolução de $20 \pm 0,05$ g amostra em 50 ml de uma solução de éter mais etanol a 95% (1% v/v), seguindo-se a adição de 10 gotas de fenolfetaleína (indicador). De seguida é realizada a titulação dos ácidos gordos livres presentes com uma solução etanólica de hidróxido de potássio (0,10 mol/L) sob agitação constante até “viragem” de cor do indicador. O resultado é dado pela seguinte equação, tendo em conta a média aritmética de três determinações:

$$A (\% \text{ ácido oleico}) = \frac{V \times C \times M}{10 \times m} \quad (6)$$

Onde: A - grau de acidez (% ácido oleico); V - volume (ml) consumido da solução de hidróxido de potássio; C - concentração (mol/ml) exata da solução de hidróxido de potássio; M - massa molar (g/mol) do ácido oleico; m - massa (g) da toma do ensaio.

3.2.4.2. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos (IP) foi determinado pelo método descrito no anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91, posteriormente alterado pelo Regulamento (CE) nº 702/2007. O IP é expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de gordura e corresponde á quantidade de substâncias presentes na amostra capazes de oxidar o iodeto de potássio em meio ácido. O método consiste na dissolução de 1,20-2,00 g de amostra em 10 ml de clorofórmio (concentração comercial), sob agitação rápida. De seguida é adicionado 15 ml de ácido acético glacial (concentração comercial) e 1 ml de uma solução saturada de iodeto de potássio, tapando-se da luz e deixando-se repousar durante cinco minutos na ausência de luz. Seguidamente, é adicionado 75 ml de água destilada e procede-se à titulação com uma solução de tiosulfato de sódio (0,01N), usando-se como indicador uma solução de amido. A titulação é realizada sob agitação constante até se obter uma coloração negra. Após realização da análise, o índice de peróxidos é determinado pela equação seguinte:

$$\text{IP (meq oxigénio/Kg)} = \frac{V \times N \times 1000}{m} \quad (7)$$

Onde: V – volume (ml) gasto de tiosulfato de sódio; N - normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio usada; m - massa (g) da toma de amostra em estudo.

3.2.4.3. Análise espectrofotométrica no UV

A análise espectrofotométrica no ultravioleta foi realizada pelo método descrito no anexo IX do Regulamento (CEE) N.º 2568/91 posteriormente alterado pelo Regulamento (CE) N.º 702/2007. A análise consta na dissolução de 0,25 g de amostra em iso-octano num balão volumétrico de 25 ml com posterior homogeneização. A quantidade de iso-octano utilizado é a quantidade necessária para completar o volume do balão. De seguida, procede-se à leitura das absorvâncias no espectrofotómetro nos comprimentos de onda de 232 nm e 270 nm para determinação dos valores de K_{232} e K_{270} , e nos comprimentos de onda de 266 nm e 274 nm para determinação do valor de ΔK . A partir das leituras efetuadas os valores dos coeficientes de extinção específicos e ΔK foram calculados através das seguintes relações:

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{c \times b} \quad (8)$$

Onde: K_{λ} - coeficiente de extinção específica no comprimento de onda λ ; A_{λ} - absorvância no comprimento de onda λ ; c - concentração (g/100ml) da solução, b - espessura da tina (cm).

$$\Delta K = K_{270} - \frac{K_{266} - K_{274}}{2} \quad (9)$$

Onde: K_{270} - coeficiente de extinção específica no comprimento de onda de 270 nm; K_{266} - coeficiente de extinção específica no comprimento de onda de 266 nm; K_{274} - coeficiente de extinção específica no comprimento de onda de 274.

3.2.4.4. Viscosidade e Densidade

A viscosidade é uma característica dos líquidos que se descreve pela medida da resistência ao escoamento que um fluido oferece. A viscosidade foi determinada à temperatura ambiente com aproximadamente 200 ml de amostra através de um viscosímetro, utilizando-se para tal a sonda r2 e uma velocidade contante de 200rpm (rotações por minuto).

A leitura da densidade da amostra foi realizada por intermédio de um densímetro de gama 0,900 g/ml – 1,00 g/ml à temperatura ambiente e com aproximadamente 250 ml de amostra.

3.2.4.5. Avaliação Instrumental da Cor

A medição da cor foi realizada diretamente pela leitura das coordenadas Cielab (L^* , a^* e b^*) nas amostras, utilizando um colorímetro, que consiste num aparelho de medição, com uma área de diâmetro de 8 milímetros de medição e um processador de dados. Antes da medição, o colorímetro foi calibrado por uma cerâmica branca. O valor de L^* representa a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco), o valor a^* varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e o valor b^* varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo). As medições foram realizadas numa célula para líquidos, onde foram colocadas as amostras e foram lidas as coordenadas Cielab em triplicado, à temperatura ambiente e a um ângulo de 0°C.

3.2.4.6. Quantificação de Carotenoides e Clorofilas

A quantificação de carotenoides e clorofilas foi realizada pelo método descrito por Mosquera et. al (1991) em que 7,5 g de amostra são diluídos em 25 ml de ciclohexano para posterior análise por espectrofotometria. A clorofila é medida a 670 nm enquanto os carotenoides são medidos a 470 nm. A concentração dos pigmentos é expressa utilizando as seguintes equações:

$$[\text{Clorofilas}] = \frac{\text{Abs}_{670} \times 10^6}{613 \times 100 \times \text{densidade}} \text{ mg/Kg} \quad (10)$$

$$[\text{Carotenoides}] = \frac{\text{Abs}_{470} \times 10^6}{2000 \times 100 \times \text{densidade}} \text{ mg/Kg} \quad (11)$$

3.2.4.7. Polifenóis Totais

A Quantificação Total de Polifenóis (QTP) foi realizada através do método de Follin-Ciocalteu, adaptado a partir do trabalho realizado por Yu *et al* (2002). O método consiste em adicionar num eppendorf protegido da luz 790 µl de água destilada, 10 µl de amostra e 50 µl de reagente de Folin-Ciocalteu com posterior homogeneização da solução recorrendo ao vortex. Após 2 minutos de repouso, adiciona-se 150 µl de Na₂CO₃ a 20% (p/v), homogeneizando-se novamente. A reação foi incubada por um período de 1 hora, em local protegido da luz, após o qual foi medida a absorvância a 755 nm. Para a quantificação total de polifenóis foi ainda realizado três soluções de ácido gálico preparadas a partir de uma solução de ácido gálico 0,3 mg/ml (V_f = 5 ml), que foram analisadas no espectrofotómetro no mesmo comprimento de onda, para a posterior realização de uma curva padrão. Com a reta de regressão linear da curva padrão (12) e com as absorvâncias das amostras, é possível retirar-se as concentrações de polifenóis totais:

$$Y = m \cdot X + b \quad (12)$$

Onde: Y – absorvância das soluções; X – concentração de polifenóis totais (mg ácido gálico/g).

3.2.4.8. Avaliação da Capacidade de Redução do Radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH pelas amostras em estudo foi avaliada a partir da adaptação do método descrito por Duan *et al.* (2006). Para tal, prepara-se previamente uma solução de DPPH 0,1 mM em metanol. Num microtubo junta-se 10 µL de amostra a 990 µL da solução de DPPH e coloca-se no vórtex. Guarda-se à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos, procedendo-se à leitura da absorvância a 517nm. A capacidade de redução do radical DPPH é calculada através do uso da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (13)$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{controlo}}$ - absorvância do controlo (Solução de DPPH sem amostra); $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ - da amostra em teste (Solução de DPPH mais amostra); $\text{Abs}_{\text{branco}}$ - absorvância apenas da amostra (Amostra sem solução de DPPH).

3.2.4.9. Perfil de Ácidos Gordos

O perfil lipídico foi determinado pelo método descrito no anexo X do Regulamento (CEE) nº 2568/91. Esta determinação é realizada em duas fases: a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (anexo X_B do Regulamento (CEE) nº 2568/91) e a aplicação da técnica de cromatografia gasosa para determinação da composição da mistura de ésteres metílicos dos ácidos gordos (anexo X_A do Regulamento (CEE) nº 2568/91). Para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos é usado o método da transesterificação a frio por meio de uma solução metanólica de hidróxido de potássio, uma vez que as amostras a analisar têm como matéria-prima azeite virgem extra com acidez inferior a 3,3%. Para tal, coloca-se num tubo de ensaio com tampa de rosca, cerca de 0,1 g de amostra e 2 ml de heptano, com posterior agitação recorrendo ao vortex. É adicionado á solução 0,2 ml de uma solução metanólica 2N de hidróxido de potássio, agitando-se energeticamente durante 30 segundos. Seguidamente, a solução é deixada a repousar até que a parte superior da solução esteja límpida. Decanta-se a camada superior (contêm os esterres metílicos). A solução está pronta a ser analisada por cromatografia gasosa. A coluna cromatográfica Trace TR-FAME usada na análise possui 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura. O equipamento após análise das amostra fornece cromatogramas, que a partir dos quais e pela área dos seus picos,

relacionados com tempos de retenção comparados com os padrões internos, consegue-se calcular as percentagens de cada ácido gordo. As amostras foram realizadas em triplicado e o resultado é expresso em percentagem de cada ácido gordo. As condições de operação estão descritas no anexo I, tabela 7.1.

3.2.4.10. Análise Sensorial

A análise sensorial consistiu na avaliação do perfil sensorial dos diferentes azeites e de uma prova de aceitação por um painel de provadores, bem como na realização de um teste de consumidores. O perfil sensorial foi realizado tendo como base uma série de documentos standarizados, nomeadamente ISO 6658:1985; ISO 11035:1994; ISO 11036:1994 e a ISO 4121:1987. Para a realização das provas, foi utilizado um painel semi-treinado composto por 10 provadores com idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos, em que 5 são mulheres e 5 homens, todos recrutados do universo académico da ESTM (estudantes de mestrado, bolseiros e técnicos de laboratório) e com conhecimentos adquiridos anteriormente de análise sensorial. O painel foi sujeito a treino para que todos os provadores ficassem aptos a identificar todos os descritores utilizados. A formação inicial destes provadores baseou-se em teste de: identificação de sabores básicos (doce, salgado, amargo e ácido), prova triangular para deteção de diferenças e prova de ranking de ordenação de intensidades (crescente/decrescente). Todas estas provas foram realizadas com amostras de azeite semelhante às amostras em estudo. Após formação inicial, seguiram-se duas reuniões em que foram discutidos e compreendidos todos os descritores sensoriais definidos para avaliar as amostras em estudo (anexo VI). Após estas reuniões, seguiram-se três secções de formação individuais em que os provadores colocaram em prova real os conteúdos teóricos discutidos anteriormente, avaliando para cada amostra os descritores numa escala com intensidade entre 0 e 10. Após este treino os provadores iniciaram a análise sensorial às amostras em estudo.

Na elaboração do perfil sensorial, as amostras em estudo foram avaliadas pelo painel três vezes ao longo dos cinco meses de armazenamento, a primeira no tempo inicial (após a produção), a segunda no tempo intermedio (terceiro mês) e a última ao fim de cinco meses. Para a realização das provas, o azeite foi aquecido a 28°C num recipiente fechado (num banho termostatizado e com auxílio de um termómetro inserido no azeite de modo a controlar a temperatura; o azeite ao ser aquecido favorece a evaporação e concentração de aromas) e foram utilizados copos azuis, para que os provadores não se deixarem influenciar pela tonalidade do azeite

(recipiente oficial para provas de azeite, com um formato ovalado) e vidros de relógio que funcionam como tampa (para que os aromas não se dissipem). Cada tempo de avaliação foi realizado com garrafas de azeites abertas no próprio momento. Entre cada avaliação (no mesmo tempo), os azeites foram armazenados em local protegido da luz e à temperatura ambiente. Os azeites foram codificados e avaliados por duas vezes em cada tempo de análise (t_0 – após produção; t_3 – tempo intermédio; t_5 – tempo final de armazenamento). O painel de provadores avaliou as amostras numa escala de 10 pontos para cada descritor colocando uma cruz sobre a escala de intensidade e avaliou a apreciação global de cada azeite em termos de aceitabilidade, colocando uma cruz em gosta/não gosta (anexo VII). Os resultados em cada tempo evidenciam a média de 20 avaliações.

No último tempo de análise (t_5), foi realizado um teste de consumidores (teste de preferência) fora das instalações da ESTM recorrendo a 105 provadores (consumidores) não treinados com idades compreendidas entre os 20 e 55 anos. As amostras utilizadas para a prova foram abertas no momento, codificadas e foi solicitado a cada consumidor que indica-se qual das amostras preferia em termos de apreciação global (gosta/não gosta) e a amostra que preferia em termos de cor (gosta/não gosta) (anexo VIII).

3.2.4.11. Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar as diferenças, para os valores médios de acidez, índice de peróxidos, análise espectrofotométrica no UV, polifenóis totais e capacidade de redução do radical DPPH, quer ao longo do tempo, quer entre as amostras (Controlo, Nori e Kombu) utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), com dois fatores (Zar, 2009). De referir que todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Adicionalmente, sempre que foram detetadas diferenças significativas, realizaram-se os respetivos testes de comparações múltiplas, nomeadamente, o teste de *Tukey HSD* (*Honestly Significant Difference*) (Zar, 2009). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 5% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,05$)

Adicionalmente, e de forma a avaliar a possível associação linear entre as variáveis Capacidade de Redução do Radical DPPH e a Quantidade de Polifenóis Totais,

procedeu-se ao cálculo do coeficiente de correlação linear de *Pearson*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 1% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,01$).

Para avaliar as diferenças estatisticamente significativas nas duas análises químicas realizadas aos extratos de algas (teor de polifenóis totais e capacidade de redução do radical DPPH), bem como as diferenças significativas existentes nos testes sensoriais (diferenças entre os azeites suplementados com o azeite controlo; diferenças entre tempos em cada descritor, em cada azeite) foi utilizada ANOVA, com um fator (uma vez mais, todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA devidamente validados, e sempre que estes foram violados, utilizou-se o teste não-paramétrico de *Brown-Forsythe*). Quando foram detetadas diferenças significativas, realizaram-se os respetivos testes de comparações múltiplas, nomeadamente, o teste de *Dunnett* (para avaliar diferenças com o azeite controlo em análise sensorial), o teste de *Tukey HSD* e o teste de *Games-Howell* (respetivamente, para amostras com homogeneidade e não homogeneidade de variâncias). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 5% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,05$).

Por fim, para avaliar a associação entre as duas variáveis (aceitabilidade global e preferência pelo descritor cor (análise sensorial)), foi realizado o teste de independência do Qui-Quadrado, sendo validado todos os que lhe são inerentes. Igualmente, todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância (α) de 5% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,05$).

Todos os cálculos foram efetuados com recurso ao software| BM SPSS Statistics 19.0. A análise estatística não foi utilizada para parâmetros em que pretendêssemos apenas analisar a tendência dos azeites, como viscosidade, densidade, quantificação de clorofilas e carotenoides, perfil lípido e cor. Todos os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química das algas

Com a evolução dos tempos as algas tornaram-se um ingrediente alimentar importante na cozinha mundial, especialmente no Japão, Coreia e China. Boukhari & Sophie, 1998, relataram que a maioria dos europeus e americanos usam algas processadas como aditivos na preparação de alimentos. São muitas as espécies de algas existentes (aproximadamente 45000 espécies), e muitas podem ser utilizadas na preparação de alimentos, no entanto as mais importantes e utilizadas para consumo humano são a alga Nori (*Porphyra spp.*), a alga Kombu (*Laminaria sp.*), a alga Wakame (*Undaria pinnatifida*) e a alga Hijiki (*Sargassum fusiforme*) (Ismail, 2002; McHugh, 2003).

No presente trabalho, utilizam-se as algas Nori (*Porphyra umbilicalis*) e Kombu (*Laminaria japonica*) para a realização do extrato de algas para utilização como aditivo em azeite aromatizado, devido à sua disponibilidade no mercado, ao fato de estarem aprovadas para consumo humano e serem das mais utilizadas na alimentação humana e apresentarem valores elevados de atividade antioxidante (tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Critérios de escolha das algas a utilizar no estudo.

Algas	Captura global no ano de	Atividade
	2010 em toneladas (FAO Fishery Statistic)	Antioxidante (%) (Ismail, 2002)
Nori (<i>Porphira spp</i>)	564 234	54
Kombu (<i>Laminaria japonica</i>)	73 980	51
Wakame (<i>Undaria pinnatifida</i>)	4 783	31
Hijiki (<i>Sargassum fusiforme</i>)	Sem dados	46

As algas fazem parte da dieta básica de alguns povos, e são de entre outras aplicações, um produto alimentar com elevado potencial nutricional, visto que são uma fonte de vitaminas, minerais, fibra, proteínas, antioxidantes entre outros compostos (Prabhasankas *et al.*, 2009; Ismail, 2002). As algas marinhas estão também reconhecidas cientificamente como um alimento de alto valor nutricional devido ao seu baixo conteúdo em calorias e gorduras (López-Lopez *et al.*, 2009).

Como tal, para conhecer a composição química das algas liofilizadas utilizadas no presente estudo efetuaram-se várias análises: proteína - *Kjeldahl* (NP 4488, 2009); gordura total - *Bligh & Dyer* (1959); humidade e fibra bruta - *AOAC*, 2000; cinza - Norma

Portuguesa 2032 (1998). Todos os resultados foram obtidos em grama por 100 grama de produto e encontram-se representados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Caracterização química das algas. Valor em média \pm (DP).

Parâmetro analítico	Caracterização química da alga (g/100g)	
	Alga Kombu	Alga Nori
Humidade	13,52 \pm 0,8	17,35 \pm 0,18
Cinza	13,99 \pm 0,04	13,19 \pm 0,06
Proteína Bruta	6,22 \pm 0,03	27,89 \pm 0,02
Gordura Total	1,01 \pm 0,02	0,37 \pm 0,05
Fibra Bruta	20,08 \pm 0,05	25,11 \pm 0,03

Segundo Guiry & Blunden (1991) e Anon (1982) a alga Nori contém 2,1% de teor de gorduras. O resultado obtido para o teor de gordura (0,37%) é inferior ao referenciado pelos autores, no entanto encontrando-se em conformidade com o descrito no rótulo da embalagem (0,3%). Este mesmo autor refere valores de 7,8% de cinza (resíduo inorgânico), no entanto o valor encontrado no estudo é superior (13,19%). Em termos de proteínas, a literatura define valores elevados para esta alga, segundo Levring *et al.* (1969), Anon (1982) e Nisizawa *et al.* (1987) a alga Nori apresenta um conteúdo em proteína de 25-35%, 46% e 25-50% respetivamente. De acordo com estes dados, o valor encontrado experimentalmente (27,98%) apresenta-se dentro da gama relatada pelo primeiro e último autor, encontrando-se também em conformidade com o valor descrito no rótulo do produto (29%). Em termos de fibra bruta, segundo o rótulo, a alga Nori apresenta 34,7% de fibra. O resultado obtido foi de 25,11%, valor abaixo do descrito no rótulo.

Em relação à alga Kombu, esta apresenta teores inferiores de proteína relativamente à alga Nori (Nisizawa *et al.*, 1987). Segundo Anon (1982), a alga Kombu apresenta valores de 9,1% de proteína, já o rótulo da embalagem indica um valor de 6,9% de proteínas. O resultado obtido (6,22%) vai de encontro ao descrito pelo rótulo, sendo inferior ao valor obtido para a alga Nori, nomeadamente 6,22% contra 27,89%. No que diz respeito à quantidade de lípidos, o valor encontrado experimentalmente é de 1,01%. Este valor vai ao encontro do valor relatado por Anon (1982) que relata teores de 1,3% de gordura para esta alga, ao mesmo tempo que se encontra em conformidade com o valor descrito no rótulo (1,1%). Para o teor de cinza, Anon (1982) relata 21,7% de cinza. O valor experimental (13,99%) obtido encontra-se abaixo do descrito na literatura. Em termos de

fibra, segundo o rótulo a alga Kombu tem 30% fibra. O resultado analítico obtido encontra-se abaixo, ficando-se pelos 20,08%.

As diferenças detetadas entre os resultados experimentais e o descrito na literatura pode ser consequência das diferentes condições de crescimento das algas. As algas vivem num ambiente marinho, onde têm livre acesso a nutrientes, e o seu conteúdo pode variar consoante as características do ecossistema envolvente e com fatores ambientais como temperatura, salinidade ou distribuição geográfica (Jormalainem, 2004). Conclui-se também que a utilização destas algas em preparações alimentares oferece benefícios para a saúde, devido à sua composição química (alto teor de proteínas e fibra, e baixo teor de gordura).

A liofilização é uma técnica de secagem que retira humidade contida no produto através do congelamento da parte líquida e posterior sublimação do gelo. Esta técnica é utilizada numa vasta gama de produtos (frutas, algas, legumes, produtos farmacêuticos entre outros). Os produtos liofilizados apresentam portanto baixos índices de humidade e qualidade elevada, uma vez que o processo garante a preservação da qualidade do produto (Lombrana, 1996; Ratti, 2001). As algas utilizadas no estudo foram obtidas na forma liofilizada e apresentam baixos teores de humidade como evidenciado pelas análises estando em conformidade com a literatura.

4.2. Otimização da produção de extratos de algas

Um dos objetivos deste trabalho foi a otimização da produção de extratos de algas para a suplementação em azeite aromatizado. Para a produção do extrato de algas, foram consideradas três variáveis (tabela 4.3):

- Conservação da alga (alga liofilizada vs alga hidratada),
- Solvente de extração (água, etanol e azeite aromatizado),
- Condições de operação

Tabela 4.3 – Variáveis e condições de produção do extrato de algas.

Amostra/solvente extração	Condições de operação
Alga liofilizada em etanol	Infusão de 1g de alga picada em 15 ml de solvente em placa de agitação, à temperatura ambiente e protegido da luz com papel de alumínio (condição A)
Alga hidratada em etanol	
Alga liofilizada em 50% etanol e 50% água	
Alga hidratada em 50% etanol e 50% água	
Alga liofilizada em 75% etanol e 25% água	
Alga hidratada em 75% etanol e 2% água	Infusão de 1g de alga picada em 15 ml de solvente em banho termostático (22°C e 195 rpm) e protegido da luz com papel de alumínio (condição B)
Alga liofilizada em azeite aromatizado	
Alga liofilizada em azeite aromatizado	

A seleção do método de produção dos extratos de algas foi feita com base na capacidade antioxidante dos extratos obtidos a partir da quantidade de polifenóis totais (QPT) e pela capacidade de redução do radical DPPH. Foram escolhidos estes métodos, uma vez que os polifenóis têm sido descritos como compostos com elevada atividade antioxidante, tendo capacidade para captar radicais livres e reduzir outros compostos (Scalbert *et al.*, 2005; Rice-Evans *et al.*, 1997) e porque o radical DPPH é um radical relativamente estável e funciona como exemplo do que ocorre com os radicais livres no organismo humano e é normalmente utilizado para determinação da capacidade antioxidante (Duan *et al.*, 2006). A quantificação total de polifenóis dos extratos foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu (3.2.4.7), obtendo-se os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) (figura 4.1).

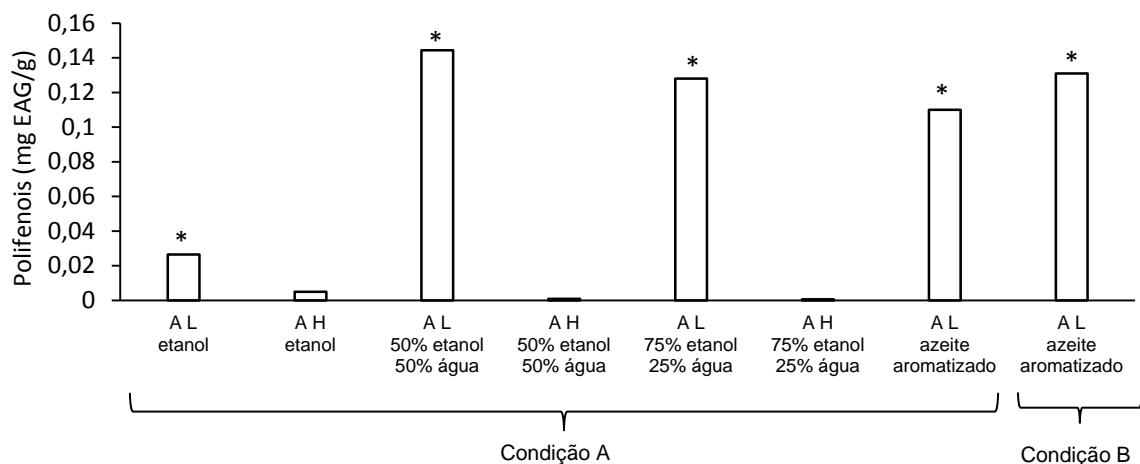


Figura 4.1 – QTP para os extratos de algas. As siglas indicam alga liofilizada (AL) e alga hidratada (AH). O símbolo * indica diferenças significativas entre extratos ($p < 0,05$).

Tal como pode ser observado pela figura 4.1, o extrato de alga liofilizada utilizando etanol e água na proporção de 50/50% como solvente é o extrato que apresenta um maior conteúdo em polifenóis totais (0,14 mg EAG/g), estando em conformidade com os resultados obtidos por Jokić e colaboradores (2010) (estes autores extrairam uma maior quantidade de polifenóis utilizando as mesmas quantidades de solvente), seguido da extração da alga liofilizada utilizando azeite aromatizado na condição B (0,13 mg EAG/g), a infusão da alga em 75% de etanol e 25% de água (0,128 mg EAG/g) e a extração da alga liofilizada em azeite aromatizado na condição A (0,11 mg EAG/g), sendo estes resultados diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

O DPPH é um radical livre relativamente estável, que pode ser reduzido por moléculas antioxidantes. O ensaio baseia-se na capacidade de moléculas antioxidantes funcionarem como dadores de hidrogénios ou redutores de radicais livres (Chew *et al.*, 2008). A capacidade de redução do radical DPPH (determinada pelo método descrito em 3.2.4.8) demonstrada pelos extratos das algas em estudo encontra-se representada na figura 4.2.

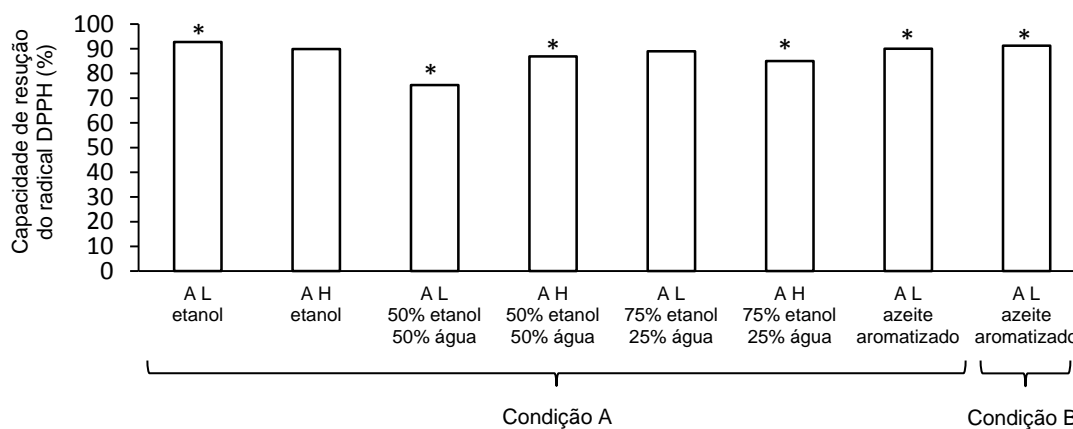


Figura 4.2 – Capacidade de redução do radical DPPH por parte dos extratos de algas. As siglas indicam alga liofilizada (AL) e alga hidratada (AH). O símbolo * indica diferenças significativas entre extratos ($p < 0,05$).

Pela figura 4.2 verificamos que o extrato que apresenta uma maior capacidade de redução do radical é o extrato produzido com a alga liofilizada em etanol (92,7%), seguindo-se o extrato realizado com alga liofilizada em azeite aromatizado na condição B (91,24%), e a extração da alga liofilizada em azeite aromatizado na condição A (90%). A grande diferença de resultados de capacidade de redução aqui evidenciado vai de acordo com a análise de Duffy & Power (2001), que afirma que diferentes amostras e diferentes

solventes originam diferentes potenciais. Segundo Celikler *et al.*, 2009, existe correlação entre a quantidade de polifenóis e a capacidade de redução do radical DPPH, no entanto neste caso o mesmo não se verifica, uma vez que o extrato com quantidade superior de polifenóis não foi o extrato que apresentou maior valor de capacidade de redução.

Para a seleção da apresentação da alga e do solvente de extração, foram avaliados em conjunto os dois parâmetros analisados, do qual se escolheu a alga na forma liofilizada em azeite aromatizado como solvente de extração nas condições de operação B. A escolha das condições de operação e do solvente justifica-se por dois motivos: QTP superior ao valor médio de todos os processos e solvente estudados (0,13 mg EAG/g) e elevada capacidade de redução do radical DPPH (91,24%) quando comparado com os restantes extratos, mas também pelo fato de estarmos a trabalhar com o solvente que é a própria matriz alimentar, não havendo assim necessidade de se evaporar o solvente

4.3. Avaliação da estabilidade química dos azeites aromatizados com alecrim suplementados com extrato de algas

Com visto a comparar a estabilidade dos azeites aromatizados com alecrim suplementado com extrato de algas foi definido um período de 5 meses (mês a mês) e efetuadas análises químicas mensais aos produtos. Foi realizado também um estudo sensorial três vezes durante o mesmo período de tempo (tempo inicial, 3º mês e 5º mês).

4.3.1. Acidez

O grau de acidez é a medida da quantidade de ácidos gordos livres, expressa em percentagem de ácido oleico. Uma grande quantidade de ácidos gordos na forma livre indica-nos que o produto passou por processos de hidrólise ou fermentação, tornando o produto mais ácido. Quando um óleo ou gordura apresenta um elevado teor de acidez quer dizer que passou por quebras na sua cadeia lipídica, libertando os seus constituintes principais (ácidos gordos) e por esta razão é fundamental o cálculo deste índice de forma a avaliar o estado de deterioração do alimento (Jorge, 2010). Na figura 4.3 é possível visualizar-se a evolução da acidez nos três azeites.

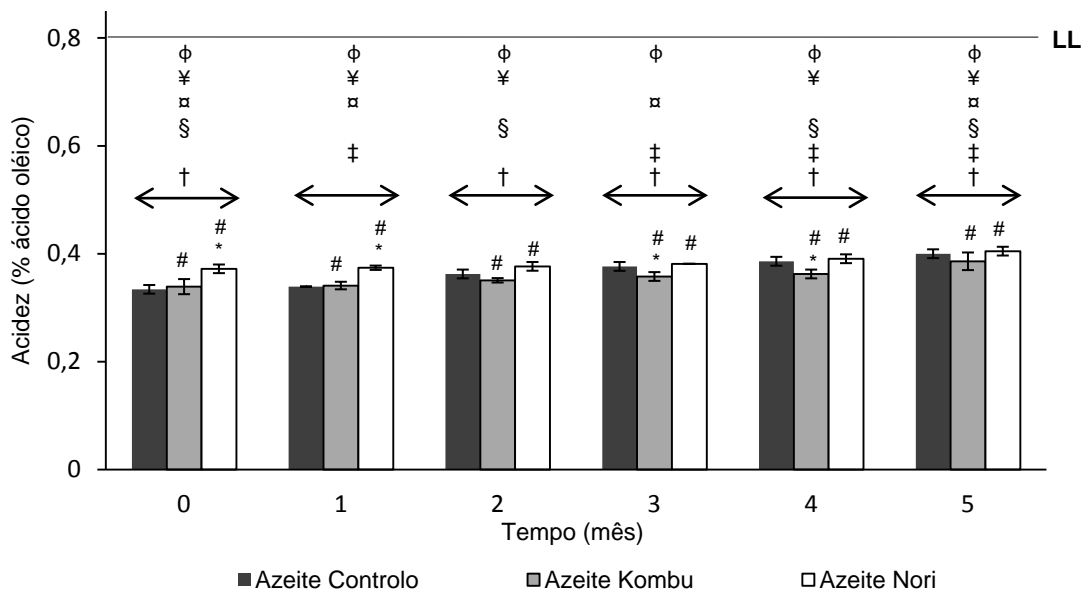


Figura 4.3 – Valores médios (\pm DP) de acidez para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento, com indicação do limite legal (LL). Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * - com o azeite controlo; # - entre os azeites suplementados; † - tempo 0 e os tempos 2,3,4,5; ‡ - tempo 1 e os tempos 3,4 e 5; § - tempo 2 e os tempos 0, 4 e 5; ¶ - tempo 3 e os tempos 0,1 e 5; φ - tempo 5 e os restantes tempos.

Pela análise da figura 4.3 verifica-se que a adição do extrato de algas (t_0) influenciou a acidez no azeite Nori (0,37% ácido oleico) quando comparado com o azeite controlo (0,33% ácido oleico) ($p < 0,05$). Já a adição do extrato de alga Kombu não afetou o resultado da acidez (0,34% ácido oleico) ($p > 0,05$). Ao fim de cinco meses de armazenamento verifica-se que existe um aumento significativo ($p < 0,05$) de acidez. Os azeites apresentam no t_5 uma acidez de 0,40% ácido oleico para o azeite controlo, 0,39 % ácido oleico para o azeite Kombu e 0,41% ácido oleico para o azeite Nori, no entanto não existem diferenças entre os azeites suplementados e o azeite controlo ($p > 0,05$).

Pela análise dos resultados constata-se que está a ocorrer uma hidrólise dos triacilgliceróis em ambos os azeites (dando origem à libertação de ácidos gordos e glicerol), sendo responsável pelo aumento ligeiro da acidez, como referenciado por Jorge (2010). Conclui-se ainda que a adição do extrato de algas não produz efeito positivo na acidez dos azeites suplementados, isto porque, ao fim de cinco meses não existem diferenças significativas entre os dois azeites suplementados e o controlo ($p < 0,05$). Se compararmos os azeites suplementados entre si, verificamos nesta situação uma acidez superior no azeite Nori, apresentando-se este mais degradado ($p < 0,05$).

Durante a infusão das algas pode ter ocorrido reações enzimáticas ou de hidrólise entre o azeite e a água presente nas algas (disponível para reações químicas) que foi responsável pelo aumento da acidez no tempo inicial nomeadamente no azeite Nori (onde se verificam diferenças significativas com o controlo). Por outro lado, segundo Panreac (1999) e Fiorino (1996), uma acidez elevada pode ser causa da utilização de azeitonas em más condições aquando da sua laboração ou o armazenamento defeituoso do azeite. Neste caso o armazenamento em garrafas de plástico pode estar a influenciar negativamente a acidez do azeite, uma vez que é um material não inerte, que não protege de fatores de deterioração do azeite, como umidade, temperatura, luz ou oxigénio (Mailer *et al.*, 2006). Relativamente a valores legais, verifica-se que todos os valores se mantêm abaixo do limite legal de 0,8% imposto pelo regulamento (CE) nº 702/2007 para azeites virgem extra (LL, figura 4.3).

4.3.2. Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos (IP) mede o estado de oxidação do azeite e indica do seu estado de deterioração. Os peróxidos são os produtos primários da oxidação que levam à formação do ranço, e daí a sua formação ter um impacto considerável no tempo de prateleira e na aceitação do produto pelo consumidor (Mailer *et al.*, 2006). Na figura 4.4 encontra-se a evolução do valor de IP ao longo de 5 meses de armazenamento.

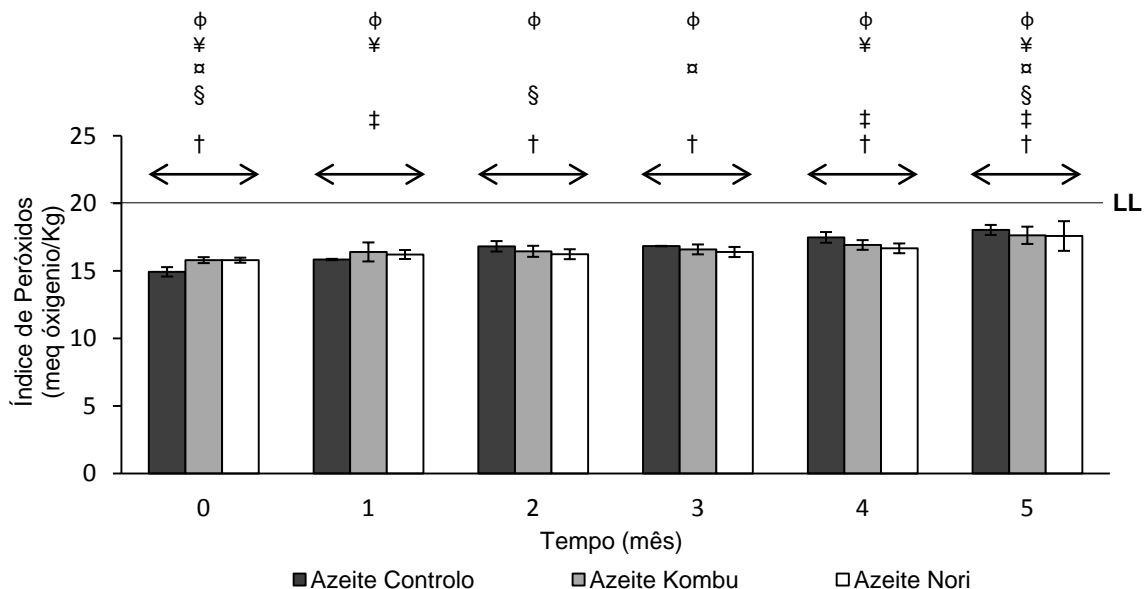


Figura 4.4 - Valores médios (\pm DP) de IP nos três azeites ao longo do tempo de armazenamento, com indicação do limite legal (LL). Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * - com o azeite controlo; # - entre os azeites suplementados; † - tempo 0 e os tempos 2,3,4,5; ‡ - tempo 1 e os tempos 4 e 5; § - tempo 2 e os tempos 0 e 5; ¶ - tempo 3 e os tempos 0 e 5; ¤ - tempo 4 e os tempos 0,1 e 5; φ - tempo 5 e os restantes tempos.

No primeiro tempo de análise (t_0) verifica-se que os azeites apresentam um valor elevado de IP, 14,926 meq O_2 /Kg; 15,793 meq O_2 /Kg e 15,788 meq O_2 /Kg para o azeite Controlo, Kombu e Nori respetivamente, no entanto não se verificam diferenças significativas entre os azeites suplementados e o controlo e entre os azeites suplementados ($p>0,05$), o que se verifica igualmente ao longo dos cinco meses de armazenamento. No t_5 verifica-se um aumento do valor de IP, indicando-nos que os azeites estão mais oxidados (18,027 meq O_2 /Kg, 17,631 meq O_2 /Kg e 17,579 meq O_2 /Kg para azeite controlo, Kombu e Nori respetivamente) no entanto não existem diferenças significativas entre os azeites suplementados e o controlo e entre os azeites suplementados ($p>0,05$).

Os valores iniciais elevados de IP podem ser consequência de fatores como a utilização de um azeite virgem extra de marca branca que apresenta um valor de IP elevado (IP de 14,076 meq O_2 /Kg, anexo II, tabela 7.2), a infusão dos azeites durante doze horas sob agitação constante (presença de oxigénio) ou ainda ter origem na adição de substâncias estranhas à matéria-prima, nomeadamente o alecrim, visto que a adição do extrato de qualquer uma das algas não influenciou o valor de IP inicial nos azeites ($p>0,05$). A evolução ao longo do tempo indica-nos um aumento significativo do t_0 para o t_5 ($p<0,05$) para todos os azeites em estudo mas igual entre os três, concluindo-se que a adição do extrato de algas como medida preventiva de oxidação não se torna eficaz.

Além dos fatores descritos, a oxidação pode também estar associada ao armazenamento dos azeites em garrafas de plástico (recipiente não inerte), ao facto do oxigénio não ter sido removido da garrafa (pode existir oxigénio no espaço superior da garrafa e este dissolve-se no azeite) e estas apenas terem sido seladas com parafilme (podendo entrar oxigénio para dentro da garrafa e dissolver-se no azeite), que segundo Mailer *et al.*, (2006) são fatores importantes para a estabilidade e armazenamento de azeites. Segundo o autor, os óleos e gorduras devem de ser armazenados a temperaturas baixas, em recipientes inertes como inox ou vidro e protegido da luz. Além disso, o mesmo autor refere que o oxigénio deve de ser removido recorrendo a aspersão com nitrogénio antes da selagem do recipiente.

Os peróxidos são os compostos primários de oxidação e levam à formação de compostos com sabor e odor desagradável como o ranço (Gunstone, 2002, Kiritsakis, 1998). O ranço foi um descritor analisado sensorialmente, no entanto este não foi detetado a níveis anormais por parte do painel de provadores ao longo das análises sensoriais efetuadas (4.3.10).

Observando a figura 4.4, podemos concluir também que os valores, apesar de elevados, encontram-se dentro do limite legal máximo imposto no regulamento (CE) nº 702/2007, que é de 20 meq.O₂/kg para a categoria de azeites (LL, figura 4.4).

4.3.3. Análise espectrofotométrica no UV

A análise espectrofotométrica na região do UV fornece informações sobre a qualidade de um óleo, sobre seu estado de conservação e sobre alterações causadas pelo seu processamento (Kiritsakis, 1992; Boskou, 1998). Esta análise está interligada com os processos de oxidação no produto. As medidas de absorção específicas no ultravioleta, em 232 nm e 270 nm, são parâmetros utilizados para se determinar a pureza, estado de conservação e a categoria de um azeite, principalmente se estivermos a tratar de um azeite virgem extra. Quando estes valores aumentam ou ultrapassam o limite permitido pelos órgãos regulamentadores, os quais são previstos para cada categoria de azeite, podem indicar a presença de azeites de baixa qualidade, que sofreram adulterações como componentes anormais adicionados e uma aceleração no processo de degradação do azeite.

A formação do produto primário de oxidação (peróxidos) também pode ser monitorizada pela medição do valor de K_{232} . Os compostos carbonilo (aldeídos e cetonas) são os produtos secundários de oxidação mais abundantes formados nos óleos comestíveis. A absorção no ultravioleta a 270nm (K_{270}) é um dos marcadores utilizados para acompanhar a oxidação secundária. Os azeites virgens de boa qualidade e que são armazenados em condições adequadas possuem pequenas quantidades destes produtos de oxidação, e com isso, valores baixos de absorção a 270 nm (Aparicio, 2003; Aued-Pimentel *et al.*, 1994).

A evolução dos parâmetros em relação ao tempo inicial pode ser observada na figura 4.5. Os resultados estão normalizados de forma a verificar-se a evolução comparativamente ao tempo inicial.

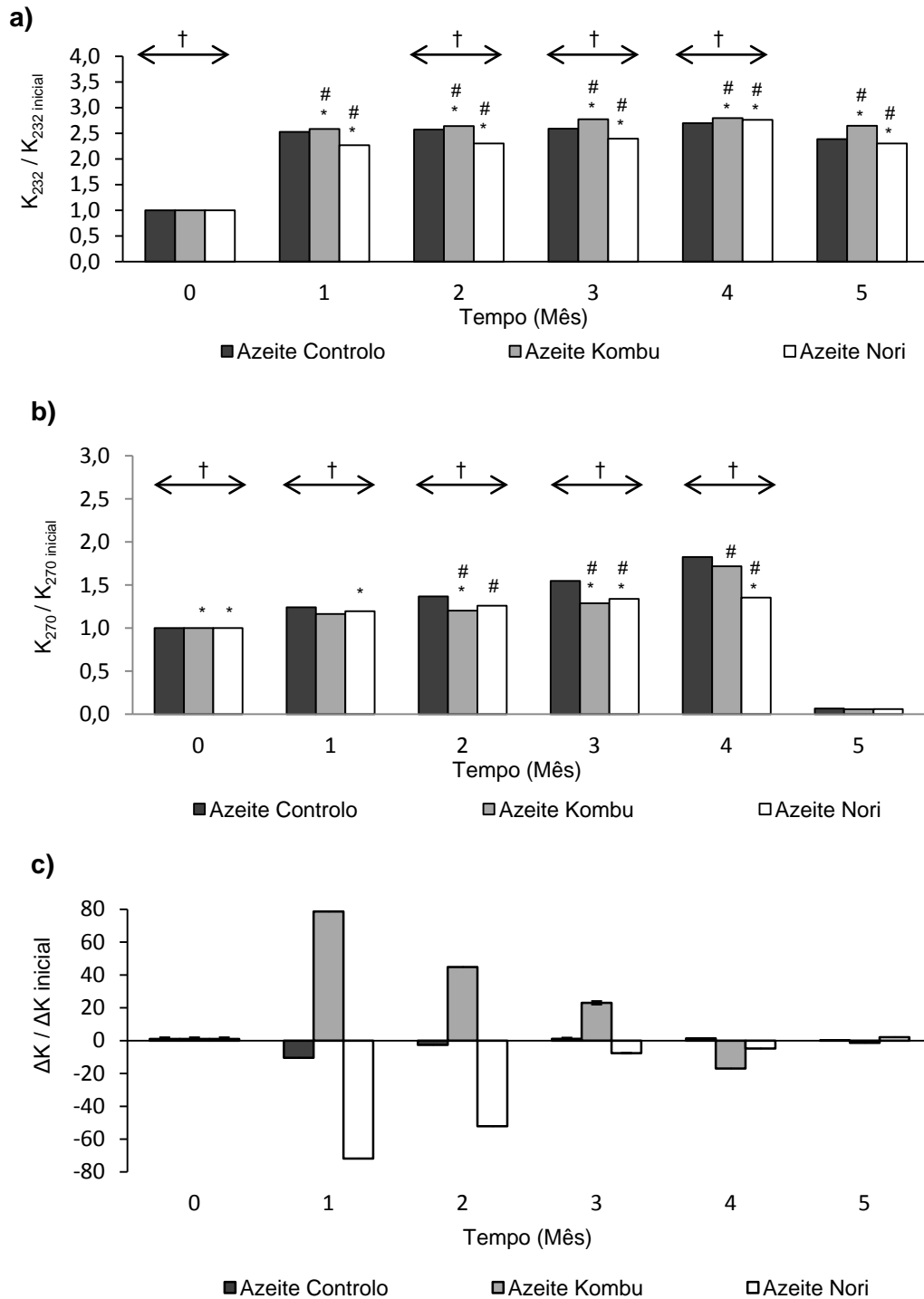


Figura 4.5 - Valores médios (\pm DP) de $K_{232}/k_{232 \text{ inicial}}$ (a), $K_{270}/K_{270 \text{ inicial}}$ (b) e $\Delta K/\Delta K_{\text{inicial}}$ (c) nos três azeites ao longo do tempo. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * - com o azeite controlo; # - entre os azeites suplementados; † - entre os tempos descritos.

No que diz respeito aos valores encontrados no comprimento de onda de 232 nm, pela figura 4.5a verifica-se uma tendência de aumento do valor de K_{232} ao longo do tempo de armazenamento quando comparado com o tempo inicial, verificando-se no t_5 uma descida para valores iguais ao do t_1 ($p < 0,05$).

Ao longo do tempo de armazenamento e até ao t_4 , verifica-se um aumento do valor de $K_{232}/K_{232 \text{ inicial}}$, indicando-nos que o valor de K_{232} é maior comparativamente ao valor inicial. Este resultado pode ser indicação de formação de peróxidos. Facto este que corrobora com os resultados obtidos na análise de IP e que também estão relacionados com a fase descende da curva de propagação de oxidação (Scahich, 2005). No entanto em t_5 verifica-se uma diminuição de IP, indicando-nos que apesar do IP ainda não ter atingido o limite legal, o azeite já se encontra num estado de deterioração muito elevado. Mais se verifica que à exceção do t_0 (em que a adição de algas não provocou alterações neste coeficiente ($p > 0,05$), todos os azeites são diferentes entre si ($p < 0,05$).

A variação do valor de K_{270} relativamente ao valor de $K_{270 \text{ inicial}}$ (figura 4.5b) indica-nos valores superiores em cada tempo de análise relativamente aos valores iniciais, dando-nos informação de perda de qualidade dos azeites ao longo do tempo com a formação de compostos secundários de oxidação (como cetonas e aldeídos). A descida dos valores obtidos no t_5 acompanha a descida do valor de K_{232} no mesmo tempo, indicando-nos um estado de deterioração elevado dos azeites e igual para os três, uma vez que não se detetam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Para este parâmetro, a adição do extrato de algas influenciou o valor do coeficiente K_{270} , uma vez que os dois azeites suplementados são estatisticamente diferentes do azeite controlo ($p < 0,05$) no t_0 .

O valor de $\Delta K/\Delta K_{\text{inicial}}$ é igual estatisticamente para todos os azeites e para todos os tempos de análise ($p > 0,05$). Para ambos os parâmetros em estudo (K_{232} , K_{270} e ΔK), verifica-se que os azeites suplementados Nori e Kombu seguem a mesma tendência do azeite controlo ao longo dos cinco meses de armazenamento. Verifica-se também que os resultados presentes neste estudo estão de acordo com o descrito por Santos (2009), onde ocorre um aumento gradual no valor obtido para os parâmetros K_{232} e K_{270} e uma estabilização no valor de ΔK ao longo de seis meses de estudo. No entanto, o estudo desenvolvido por Bilancia e seus colaboradores (2007) constata-se ligeiras oscilações (intervalo entre 1,388-1,782 para K_{232} e 0,130-0,309 para K_{270}) nos valores obtidos para todos os parâmetros anteriormente referidos, para um período de armazenamento de 12 meses.

Um dos fatores que contribui para valores elevados de absorção por parte dos azeites é as condições de conservação. Segundo Mailer *et al.* (2006) azeites armazenados em boas condições (sem a presença de oxigénio, material inerte, pouca luminosidade entre outros) apresentam baixas quantidades de produtos de oxidação. Neste caso próprio,

mais uma vez podemos referir que os azeites foram armazenados em garrafas de plástico e selada com parafilme que não sela a garrafa por completo, podendo estar a passar oxigénio para dentro da garrafa levando à oxidação do óleo, com formação de produtos de oxidação e consequente aumento dos índices de absorção.

4.3.4. Viscosidade e Densidade

Para além dos parâmetros legislados, existem outros parâmetros que são utilizados na caracterização da qualidade dos azeites, como é o caso da densidade e viscosidade (Ayadi, 2009). A evolução ao longo do tempo do parâmetro viscosidade e densidade pode ser observado de seguida.

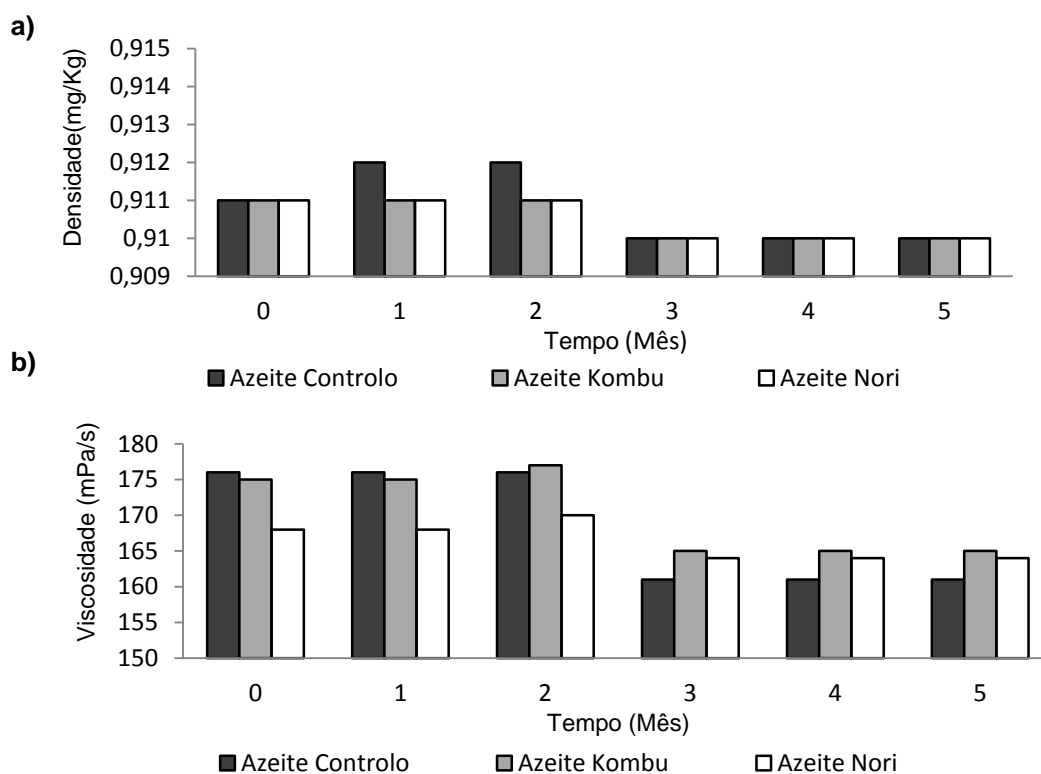


Figura 4.6 - Valores médios (\pm DP) de densidade (a) e viscosidade (b) para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.

No que diz respeito à densidade (figura 4.6a), verifica-se que a adição do extrato de algas não causou alterações neste parâmetro no t_0 , ambos os azeites apresentam 0,911 g/ml de densidade. Ao longo do armazenamento, a densidade dos azeites Kombu e Nori permaneceu constante até ao t_2 , verificando-se de seguida um decréscimo de densidade para valores de 0,910 g/ml para ambos os azeites. Já o azeite controlo aumentou de densidade do t_0 para o t_1 (0,911 para 0,912 g/ml), mantendo-se constante até ao t_2 , decrescendo de seguida para valor igual à dos azeites Kombu e Nori no t_3 (0,910 g/ml).

Após o qual e até ao fim do tempo de armazenamento a densidade dos três azeites manteve-se constante em 0,910 g/ml.

Para o parâmetro viscosidade (figura 4.6b), verifica-se que a adição do extrato de algas influenciou a viscosidade dos azeites. A migração de compostos das algas para o azeite pode estar na origem desta diferença. Inicialmente (t_0) a viscosidade do azeite controlo foi superior à dos azeites suplementados, este apresentou uma viscosidade de 176 mPa contra uma viscosidade de 175 mPa para o azeite Kombu e 168 mPa para o azeite Nori. Em termos de alteração da viscosidade, verifica-se apenas alteração a partir do t_2 inclusive. Ao fim de cinco meses de armazenamento (t_5), a viscosidade diminui para todos os azeites quando comparados com a viscosidade inicial; passando a 161 mPa para azeite Controlo, 165 mPa para azeite Kombu e 164 mPa para azeite Nori.

A descida da viscosidade e da densidade do t_2 para o t_3 pode ter origem no aumento da temperatura exterior (24,8°C no t_3 contra 23,1°C no t_2) aquando da realização da análise. Quanto maior a temperatura menor a densidade e viscosidade.

Em termos de viscosidade, o aumento da temperatura aumenta os movimentos das moléculas e reduz as forças intermoleculares de modo que as camadas do líquido passam mais facilmente umas sobre as outras, contribuindo para a redução da viscosidade (Siddique *et al.*, 2010). Segundo Kim *et al.* (2010), a viscosidade está relacionada com as propriedades químicas do óleo, assim como o comprimento da cadeia e a relação saturação/insaturação. Tem vindo a ser reportado que a viscosidade diminui com o aumento da insaturação e aumenta com elevado grau de saturação. Os resultados para os azeites Kombu e Nori do t_2 para o t_3 vão de acordo com a relação descrita por Kim *et al.* (2010), visto que o grau de insaturação nestes azeites aumentou no mesmo período, levando a uma diminuição da viscosidade. Para o azeite Controlo, verifica-se uma diminuição da viscosidade, no entanto a relação proposta pelo autor não se aplica visto que se verifica uma diminuição do grau de insaturação neste azeite, logo a viscosidade deveria de aumentar o que não se verifica, concluindo-se que não é possível constatar se a relação proposta pelo autor se enquadra.

4.3.5. Cor

O azeite virgem tem uma cor que vai desde o verde-amarelado até ao dourado, dependendo da variedade e do estado de maturação da azeitona. A cor do azeite, um

dos atributos básicos para avaliar a sua qualidade, é determinada pelos pigmentos existentes na sua composição. O azeite contém dois tipos de pigmentos: as clorofilas e os carotenoides (Boskou, 1998). A medição da cor, pelo método CIELAB, decorre sob a leitura dos parâmetros L^* , a^* e b^* , onde cada um distingue intervalos de cores primárias. O parâmetro L^* que mede a luminosidade e que varia entre zero (preto) e cem (branco); o parâmetro a^* que apresenta o desvio da cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos) e o parâmetro b^* que apresenta o desvio da cor entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Silva *et al.*, 2007). De seguida encontra-se a evolução ao longo de cinco meses para os três azeites em estudo.

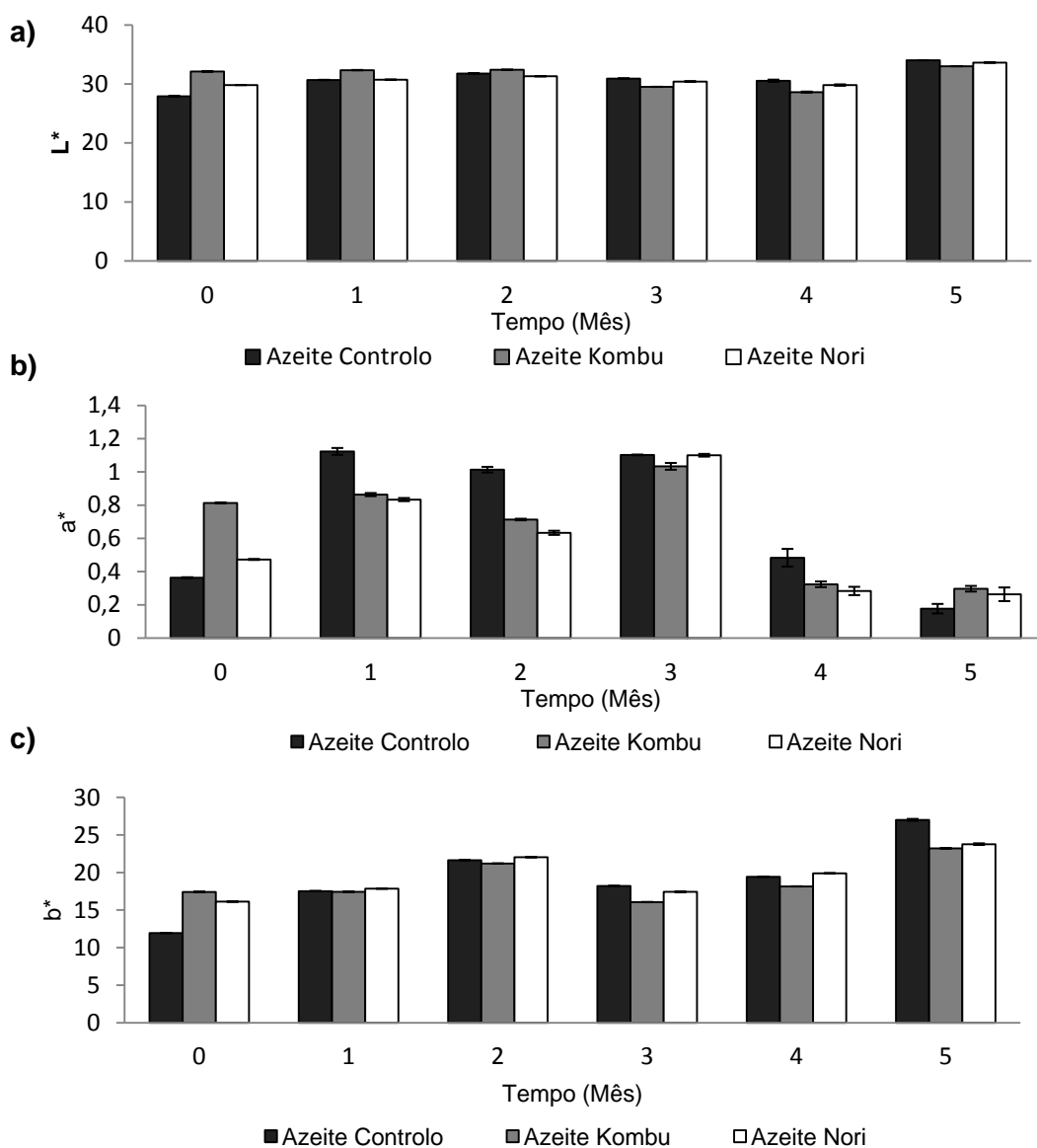


Figura 4.7 - Valores médios (\pm DP) dos parâmetros L^* (a), a^* (b) e b^* (c), para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.

Pela figura 4.7, verifica-se que os azeites Nori e Kombu, apesar de seguirem uma tendência semelhante ao controlo, apresentam valores diferentes, o que é atribuído à migração de compostos das algas durante o processo de infusão. Alguns dos compostos provenientes das algas podem ser ácidos orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos (clorofilas e carotenoides), óleos essenciais entre outros que influenciaram a cor dos azeites (López-Lopez *et al.*, 2009).

Em termos de luminosidade (L^*), verifica-se que ao fim de cinco meses (t_5), todos os azeites se apresentam mais escuros que inicialmente devendo-se ao fato de ocorrerem reações químicas, como oxidação (comprovado pelo aumento do IP e valores dos coeficientes específicos), que levam ao escurecimento do alimento (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006). Para a tonalidade esverdeada (a^*), verifica-se que durante o tempo de armazenamento ambas as amostras apresentam valores positivos, próximos de zero e a irem de encontro com a tonalidade esverdeada, característica dos azeites derivado dos pigmentos de clorofila (Kiritsakis *et al.*, 2001). Os pigmentos de clorofila existentes nas algas e que migraram para o azeite durante a infusão, aumentaram o valor de clorofilas no t_0 .

Para o parâmetro b^* , todas as amostras apresentam uma tonalidade amarelada (inicialmente, devido à adição do extrato de algas, os azeites suplementados apresentam valores superiores ao controlo), no entanto verifica-se um aumento deste ao longo do tempo indicando a ocorrência de foto oxidação ou oxidação (na fase de terminação). A foto-oxidação é responsável pelo aumento da tonalidade amarelada nos azeites (Kiritsakis, 1992). No entanto as amostras foram armazenadas em local protegido da luz, portanto em local que as protege da foto-oxidação que ocorre na presença de luz (artificial ou natural). Posto isto, o aumento da tonalidade amarelada indica-nos a ocorrência de oxidação (comprovado com o aumento IP) encontrando-se esta na fase de terminação, onde se formam produtos monoradicaís estáveis, que são responsáveis pelo aparecimento de cor amarelada (Kiritsakis, 1987).

4.3.6. Quantificação de Carotenoides e Clorofilas

As clorofilas e os carotenoides são um importante aspeto na estabilidade oxidativa devido à sua capacidade antioxidante natural no escuro e atividade pro-oxidativa na luz e são os principais responsáveis pela cor dos azeites (Giuffrida *et al.*, 2007). De seguida está demonstrado a evolução destes dois pigmentos ao longo do tempo.

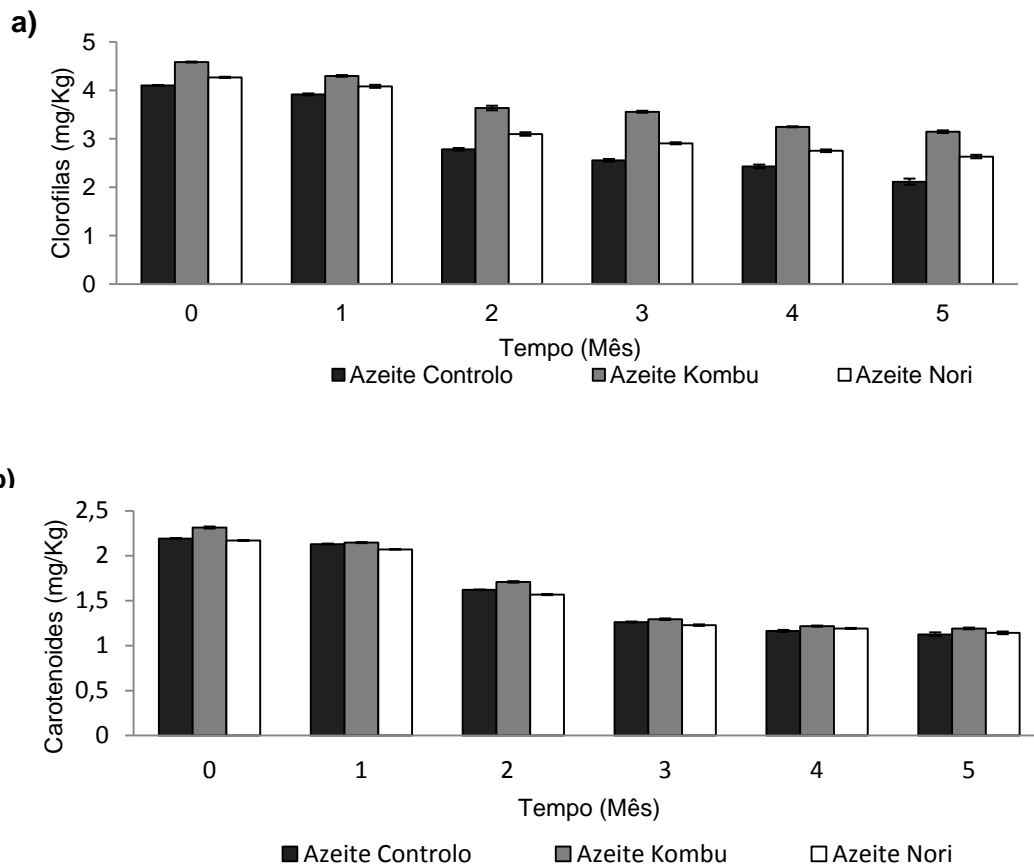


Figura 4.8 - Valores médios (\pm DP) da quantidade de clorofilas (a) e carotenoides (b) presentes nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.

As algas apresentam pigmentos de clorofila e carotenoides (Wang *et al.*, 2011), logo é de se esperar uma influência das algas na quantidade destes pigmentos, como efetivamente se verifica no tempo inicial e nos restantes tempos (figura 4.8).

Pela análise da figura 4.8a verifica-se um decréscimo da quantidade de clorofila nos azeite ao longo do seu período de armazenamento. Inicialmente, a quantidade de clorofilas presente nos três azeites foi de 4,101 mg/Kg; 4,584 mg/Kg e 4,268 mg/Kg para o azeite Controlo, azeite Kombu e azeite Nori respetivamente. Após cinco meses de armazenamento os azeite apresentam teores inferiores, respetivamente 2,113 mg/Kg para azeite Controlo, 3,146 mg/Kg para azeite Kombu e 2,632 mg/kg para o azeite Nori, sendo o azeite Kombu a apresentar um índice mais elevado.

A evolução dos carotenoides nos azeites é semelhante à evolução das clorofilas (figura 4.8b). Inicialmente, a quantidade de carotenoides nos azeites foi de 2,192 mg/Kg, 2,314 mg/Kg e 2,170 mg/Kg para azeite Controlo, azeite Kombu e azeite Nori respetivamente.

Após cinco meses, os azeites apresentam valores inferiores, sendo o valor deste parâmetro superior para o azeite Kombu, com uma quantidade de carotenoides de 1,191 mg/kg, seguindo o azeite Nori e o azeite Controlo, com respetivamente 1,142 mg/kg e 1,125 mg/kg de carotenoides.

Segundo Mínguez-Mosquera *et al.*, (1989), o azeite virgem extra normalmente relata teores de carotenoides entre 1 a 10 mg/Kg, já para a clorofila, o mesmo autor e Gandul-Rojas *et al.*, (1996), relatam valores que estão compreendidos entre 1 e 24 mg/Kg. Em ambos os casos, e como a matéria-prima destes azeites é um azeite virgem extra, os valores encontrados para os três azeites estão concordantes com os valores encontrados por estes autores, em todos os tempos de análise.

A degradação dos carotenoides está relacionada com a presença de oxigénio e como não temos 100% de certeza da eficácia da selagem das garrafas, pode estar a entrar oxigénio em quantidades significativas que levem à degradação destes pigmentos. A presença de radicais livres no azeite também influencia a quantidade de carotenoides, havendo uma diminuição destes com o aumento dos radicais livres (Gross, 1991). A diminuição de clorofilas pode estar relacionada com a diminuição de carotenoides uma vez que os carotenoides funcionam como “protetores” da destruição da clorofila quando expostos a alguns agentes, como o oxigénio. A presença de menos “proteção” e oxigénio leva a uma degradação da clorofila e conseqüentemente uma diminuição da quantidade no produto (Huie & Neta, 2002). As diferenças de clorofilas existentes entre azeites no mesmo tempo deve-se ao fato de durante a infusão ter ocorrido migração do pigmento das algas para o azeite, aumentando a quantidade do mesmo nos azeites suplementados. A quantidade superior de clorofila no azeite Kombu relativamente ao Nori deve-se ao fato de esta alga ser uma alga verde, predominando os pigmentos de clorofila enquanto que a alga Nori é uma alga vermelha predominando outro tipo de pigmentos além da clorofila (como carotenoides e ficoeritrina) (Lüning, 1990).

4.3.7. Polifenóis Totais

Os polifenóis são compostos que se apresentam naturalmente nos azeites e são compostos responsáveis pela estabilidade dos azeites durante o armazenamento (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006). Por outro lado, as algas apresentam propriedades antioxidantes, visto que apresentam na sua constituição compostos com propriedades

antioxidantes como os polifenóis (Wang *et al.*, 2011). Na figura 4.9 está esquematizada a evolução da quantidade de polifenóis nos azeites em estudo.

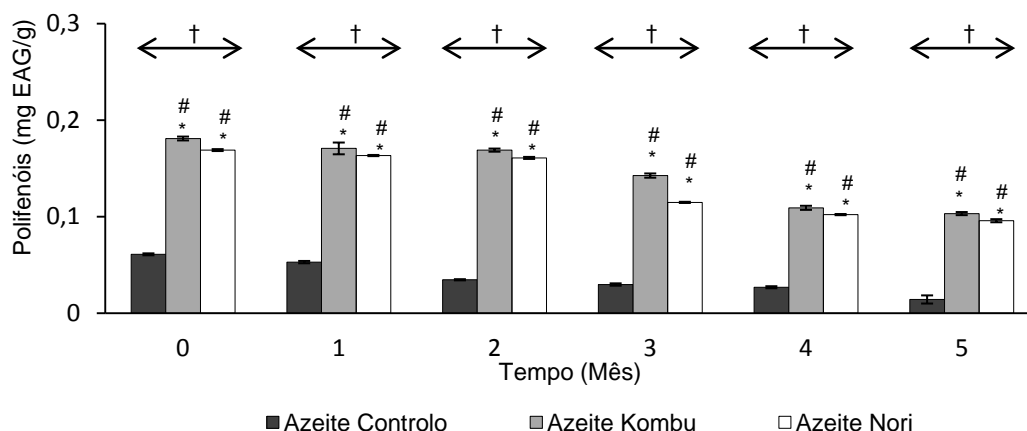


Figura 4.9 - Valores médios (\pm DP) da quantidade de polifenóis nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * - com o azeite controlo; # - entre os azeites suplementados; † - entre os tempos de análise.

Com a adição do extrato de algas ao azeite é de se esperar concentrações mais elevadas de polifenóis nos azeites Kombu e Nori em relação ao azeite controlo no t_0 , como é comprovado pela figura 4.9. Verifica-se também diferenças significativas entre os azeites suplementados e o controlo ($p < 0,05$), apresentando o azeite Kombu uma quantidade de polifenóis superior (0,181 mg GAL/g), seguindo-se o azeite Nori (0,169 mg GAL/g) e por último o azeite controlo (0,061 mg GAL/g). A partir dos resultados, podemos concluir que existem igualmente diferenças significativas entre os dois azeites suplementados ($p < 0,05$), indicando-nos que o tipo de alga influencia este parâmetro, alcançando-se uma concentração de polifenóis no azeite superior com a alga Kombu. Ao longo do tempo de armazenamento, observa-se um decréscimo na quantidade de polifenóis para os três tipos de azeites, permanecendo o azeite Kombu com uma quantidade de polifenóis superior seguindo-se o azeite Nori e Controlo - 0,103 mg GAL/g, 0,096 mg GAL/g e 0,014 mg GAL/g ($p < 0,05$).

Como era esperado, verifica-se uma quantidade superior de polifenóis nos azeites suplementados devido à presença de compostos com propriedades antioxidantes presentes nas algas (Wang *et al.*, 2011). Verifica-se também uma diminuição para todos os azeites ao longo dos cinco meses ($p < 0,05$), o que também era esperado uma vez que segundo Mello (2001), estes são compostos facilmente oxidáveis (pelo oxigénio por exemplo).

Os polifenóis são compostos antioxidantes capazes de inibir a oxidação de moléculas e eliminar radicais livres, aumentando a estabilidade do produto alimentar ao longo do seu tempo de conservação (Huang, 2008). A adição do extrato de algas faz aumentar significativamente o teor de polifenóis no azeite, no entanto este aumento não é suficiente para preservar a qualidade do azeite (atuando como antioxidantes), visto que se verifica um aumento de IP ao longo do tempo igual para os três azeites em estudo. Os azeites Kombu e Nori apresentam um teor superior de polifenóis, e por tal deveriam, ao longo do tempo apresentar um valor de IP inferior ao do azeite Controlo, devido à ação antioxidante dos polifenóis, o que não se verifica (o valor de IP é igual nos três azeites), e como tal, o aumento da concentração de polifenóis pela adição do extrato de algas não favoreceu positivamente a estabilidade dos azeites.

A adição do extrato de algas ao azeite (com conseqüente aumento do teor de polifenóis) no entanto enriquece o produto, aumentando o benefício do consumo de azeite para a saúde do consumidor, visto que são compostos com propriedades antioxidantes, que protegem por exemplo contra o cancro (pele, peito e cólon), doenças coronárias, e agem contra o stress oxidativo das células (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2006; Huang, 2008).

Por outro lado estes resultados podem ser devidos ao fato do reagente de Folin-Ciocalteu não reagir especificamente com os compostos fenólicos, já que pode oxidar outros compostos que não fenólicos (Prior, 2005) que possivelmente não apresenta uma atividade antioxidante tao intensa. Por outro lado, os compostos fenólicos totais podem não incluir necessariamente todos os compostos antioxidantes dos extratos (Ganhão *et al.*, 2010).

Em termos bibliográficos, a quantidade de polifenóis num óleo pode variar de 0 a 1000 ppm ou mais. Normalmente o intervalo varia entre 60 a 400 ppm (0,06 mg/g e 0,4 mg/g), (Mailer, 2006). Verifica-se que inicialmente e ao longo do tempo de armazenamento os três azeites apresentam-se dentro desta gama, ultrapassando para níveis inferiores apenas o azeite controlo após o t_1 .

4.3.8. Capacidade de Redução do Radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante dos azeites foi realizada através da medição da capacidade dos mesmos em sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está esquematizado na figura 4.10. O radical DPPH tem sido extensamente utilizado como

radical livre para avaliar as substâncias antioxidantes que reduzem o DPPH doando um átomo de hidrogénio para formar um composto não radical (DPPH-H) (Cho *et al.*, 2011).

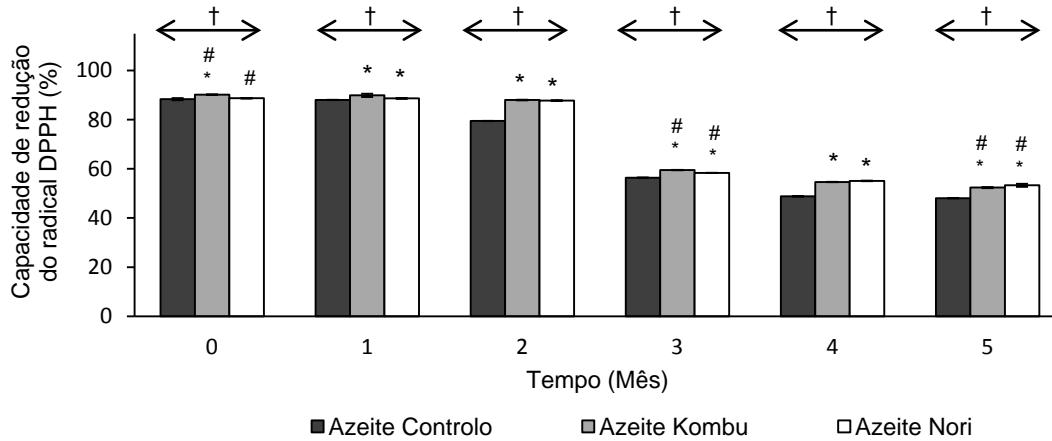


Figura 4.10 - Valores médios (\pm DP) da capacidade antioxidante nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento. Os símbolos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$): * - com o azeite controlo; # - entre os azeites suplementados; † - entre os tempos de análise.

Analisando a figura 4.10, verifica-se no t_0 que os azeites apresentam uma capacidade de redução do radical DPPH de 88,045%, 89,906% e 88,662% (azeite Controlo, Kombu e Nori respetivamente), no entanto apenas existe diferenças significativas entre o azeite suplementado Kombu e o azeite controlo e entre os dois azeites suplementados ($p < 0,05$). A adição do extrato de alga Nori, não influencia este parâmetro no t_0 ($p > 0,05$). Ao longo do tempo de armazenamento o poder de redução dos azeites diminui. Ao fim de cinco meses de armazenamento os azeites apresentam diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), reduzindo a capacidade de redução para 48,07%, 52,38 % e 53,30 % (azeite controlo, Kombu e Nori respetivamente), sendo o azeite Nori a apresentar o maior poder antioxidante.

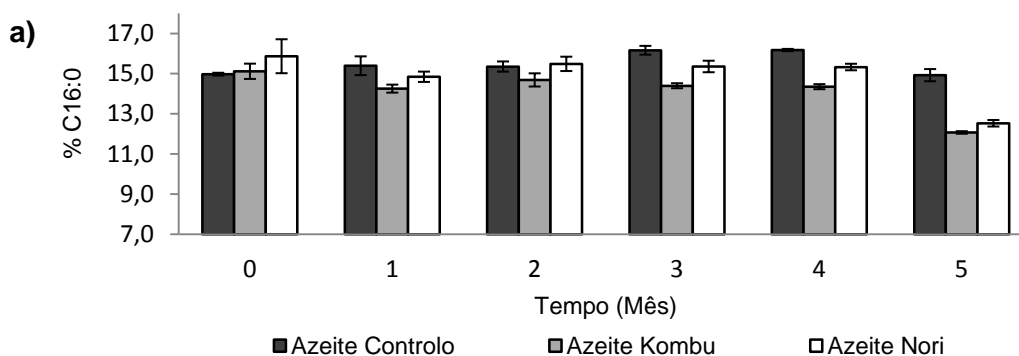
Após a realização dos extratos (t_0), o valor da capacidade antioxidante das algas no azeite apresentou-se elevada, sendo de 89,906% e 88,662% para azeite Kombu e azeite Nori respetivamente. As algas Kombu e Nori apresentam de acordo com um estudo de Ismail *et. al*, uma atividade elevada de 54% e 51% quando utilizado água como solvente de extração e 57% e 55% respetivamente quando utilizado etanol como solvente. Comparando o resultado experimental com os descritos pelo autor, verifica-se que os azeites em estudo apresentam uma capacidade antioxidante elevada. A causa das diferenças entre resultados é a utilização de amostras e solvente de extração diferente. Segundo Duffy & Power (2001), a utilização de diferentes amostras ou diferentes

solventes origina diferentes potenciais. Segundo Ganhão *et al.* (2010) a polaridade dos solventes tem influência sobre a quantidade de compostos fenólicos extraídos e sobre o nível de atividade antioxidante.

Como já foi referido, a capacidade de redução do radical DPPH pode estar relacionada com a quantidade de polifenóis (visto que são compostos antioxidantes) (Huang, 2008; Celikler *et al.*, 2009). Para se verificar se estes dois parâmetros estão correlacionados, foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson, tendo-se obtido um coeficiente de Pearson (r) de 0,90, 0,95 e 0,99 para o azeite controlo, Kombu e Nori respetivamente. O valor positivo obtido para o coeficiente de Pearson para as várias amostras indica-nos que existe uma correlação alta e positiva entre as variáveis atividade antioxidante (DPPH) e o conteúdo em polifenóis (índice de Folin-ciocalteu), isto é, quando uma variável aumenta/diminui a outra também aumenta/diminui, como se verifica nos resultados experimentais obtidos. A existência de uma correlação indica que os compostos fenólicos presentes no azeite aromatizado suplementado com extratos de algas tem uma influência positiva na atividade antioxidante. Os dados são coerentes com os descritos por diferentes autores que referenciaram correlações altas para os mesmos métodos (Folin-ciocalteu e DPPH) em diferentes frutas e vegetais (Ganhão *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2004; Zheng & Wang, 2001).

4.3.9. Perfil de Ácidos Gordos

O azeite é um produto composto maioritariamente por ácido oleico (C18:1), um ácido gordo insaturado que representa uma percentagem no azeite que varia entre 55-83%. O ácido presente de seguida em quantidades significativas é o ácido saturado C16:0 (ácido palmítico), representando um peso que varia entre 7,5 – 20% (Mailer, 2006).



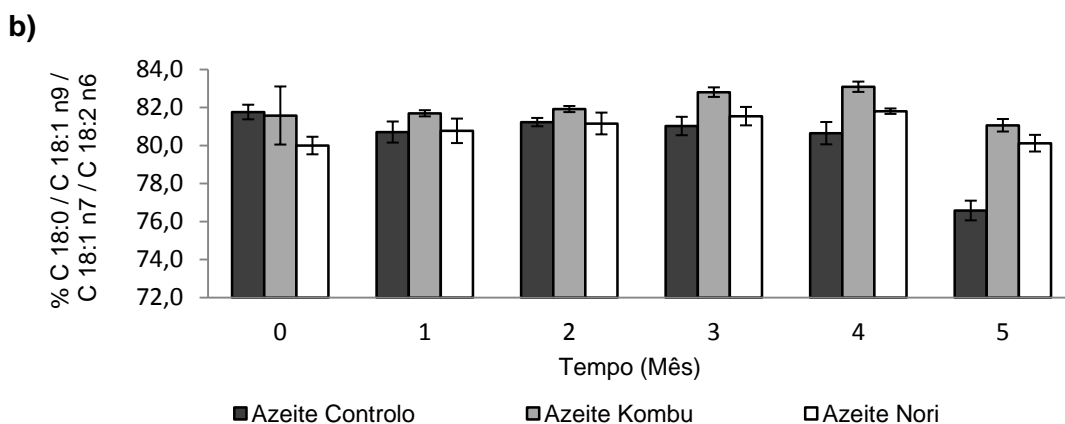


Figura 4.11 - Valores médios (\pm DP) da quantidade percentual de ácido palmítico (a) e do conjunto de ácidos gordos (b) nos três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento.

Deverá ser referido que a coluna cromatográfica utilizada nas análises não permitiu uma eluição distintiva para os ácidos gordos mencionados acima, pelo que não foi possível a identificação e determinação percentual individual. Todos os resultados, referentes aos restantes ácidos gordos, encontram-se no anexo III, tabela 7.3.

No que diz respeito aos ácidos gordos C18:0/ C18:1 n9/ C18:1 n7/ C18:2 n6 (figura 4.11b) verifica-se que desde o tempo inicial até ao tempo final o teor dos ácidos variou. Para o azeite controlo e Kombu, a percentagem destes ácidos diminuiu de 81,76% para 76,58%, e de 81,577% para 81,063% respetivamente. No mesmo intervalo de tempo, no azeite Nori verificou-se um aumento ligeiro de 79,997% para 80,120%. Quando analisamos em termos de ácido gordo saturado presente maioritariamente (figura 4.11a) verifica-se que as quantidades percentuais de ácido palmítico diminuíram do t_0 para o t_5 para os três azeites, de 14,97% para 14,92% (diferença de 0,05%) para o azeite controlo, de 15,11% para 12,07% para o azeite Kombu (diferença de 3,046%) e de 15,86% para 12,525% para o azeite Nori (diferença de 3,338%).

A adição dos extratos de algas fez com que ao fim de cinco meses de armazenamento os azeites se encontrem menos saturados e mais insaturados que o azeite controlo.

A presença de ácidos gordos insaturados faz do azeite um produto com efeito benéfico na saúde dos consumidores, contra por exemplo, a aterosclerose e doenças cardiovasculares, ou diminuição do LDL e aumento da HDL (Granados, 2000; Duarte, 2003). Os azeites suplementados Kombu e Nori apresentam quantidades superiores de ácidos gordos insaturados relativamente ao controlo, indicando-nos que estes azeites apresentam um efeito benéfico superior sobre saúde dos consumidores relativamente ao azeite controlo.

Verifica-se também que a percentagem dos dois ácidos gordos maioritários nos três azeites encontra-se dentro da gama indicada para azeites, nomeadamente, 7,5 – 20% de ácido palmítico e 55-83% de ácido oleico (Mailer, 2006).

4.3.10. Análise Sensorial

A Análise Sensorial permite determinar diferenças, caracterizar e medir atributos sensoriais dos produtos e ainda determinar se o consumidor deteta diferenças nos produtos e se os mesmos são aceites ou não pelo consumidor (Gutierrez, 2009). Nas figuras 4.12 e 4.13 encontram-se traçados os perfis sensoriais das três amostras.

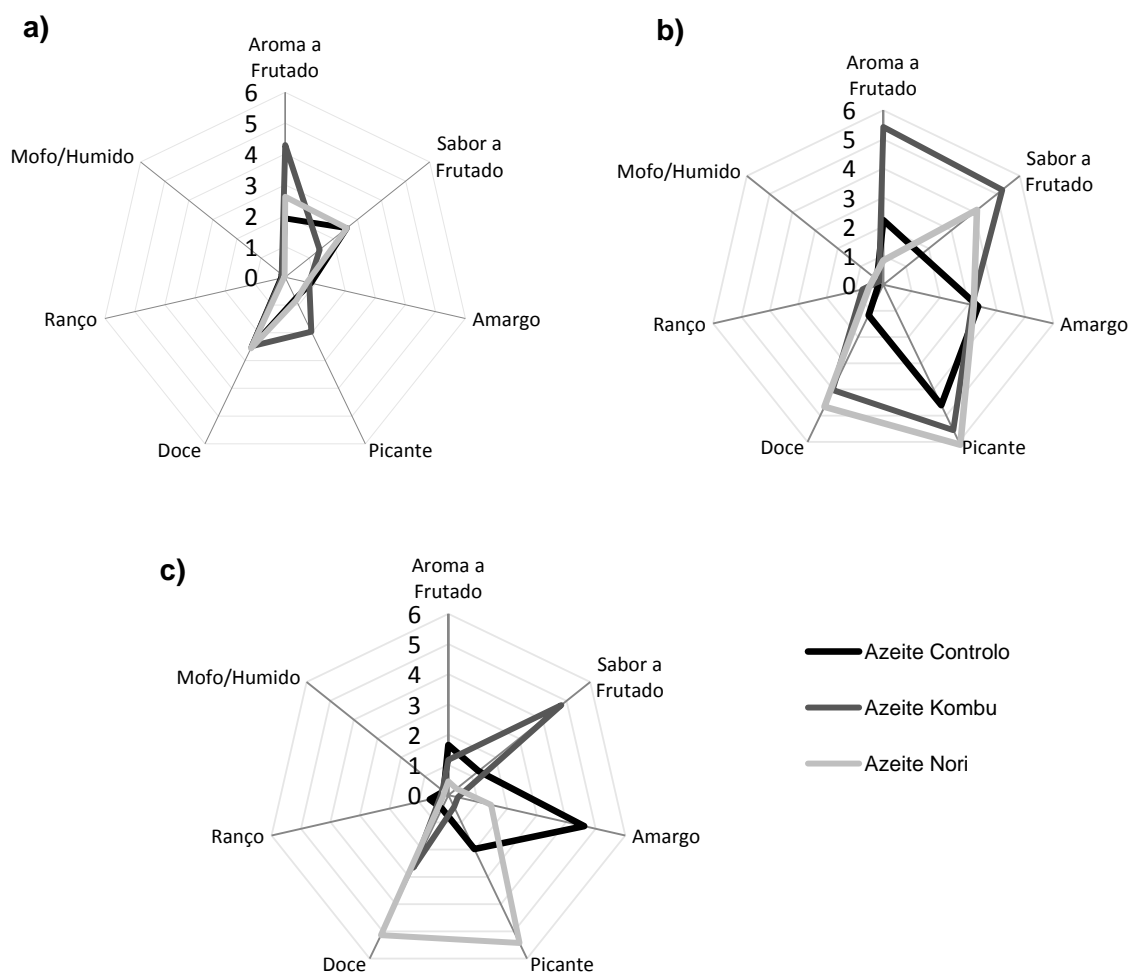


Figura 4.12 - Perfil Sensorial para as três amostras: (a) ao tempo inicial (após produção), (b) ao tempo intermedio (três meses) e (c) ao tempo final (cinco meses de armazenamento).

Após produção (t_0 - figura 4.12a), verifica-se que existem diferenças significativas entre o azeite suplementado Kombu quando comparado com o azeite controlo no que diz respeito ao aroma a frutado (antes da degustação) ($p < 0,05$) e portanto a adição do

extrato de alga Kombu favorece o aroma, já a adição do extrato de alga Nori não influencia o aroma a frutado do azeite ($p>0,05$). No que diz respeito aos descritores analisados durante a degustação, concluiu-se que apenas existem diferenças entre o azeite suplementado Kombu e o azeite controlo no descritor picante ($p<0,05$), todos os restantes descritores não apresentam diferenças estatísticas quando comparados os azeites suplementados com o azeite controlo ($p>0,05$). Neste tempo, verifica-se que os descritores positivos de qualidade do azeite (aroma a frutado e picante) são influenciados pela adição do extrato de alga Kombu, aumentando a qualidade deste azeite.

Ao fim de três meses (figura 4.12b), existem quatro descritores que ao comparar os azeites suplementados com o controlo apresentam diferenças significativas. Verifica-se que os descritores aroma a frutado, doce e sabor a frutado se apresentam distintos entre os azeites suplementados e o azeite controlo ($p<0,05$), no descritor picante, apenas existe diferenças entre o azeite Nori e o azeite controlo ($p<0,05$). Todos os restantes descritores não apresentam diferenças estatísticas quando comparados os azeites suplementados com o azeite controlo ($p>0,05$). Neste tempo de análise, em geral verifica-se uma intensidade superior dos atributos positivos (aroma a frutado, doce e sabor a frutado) nos azeites suplementados comparativamente ao azeite controlo, promovendo os azeites suplementados a uma qualidade superior ao azeite controlo.

Ao fim de cinco meses de armazenamento (figura 4.12c) os três azeites encontram-se distintos entre si apresentando padrões sensoriais diferentes, no entanto é de salientar que em termos de mofo/húmido (parâmetro negativo de qualidade do azeite) não existem alterações significativas detetadas entre azeites ao longo das análises ($p>0,05$) e que os azeites suplementados apresentam neste tempo um aroma a frutado igual ao azeite controlo ($p>0,05$). Relativamente ao ranço (outro parâmetro negativo de qualidade), verifica-se que no t_5 são detetadas diferenças entre os azeites suplementados e o azeite controlo, apresentando o azeite controlo uma intensidade superior ($p<0,05$). Nos restantes descritores, verifica-se que existem diferenças significativas entre os azeites suplementados e o azeite controlo ($p<0,05$), á exceção do sabor a frutado onde apenas é detetado diferenças entre o azeite Kombu e o azeite controlo, apresentando este ultimo um sabor mais frutado ($p<0,05$) No último tempo de análise verifica-se que o azeite controlo apresenta uma qualidade inferior aos azeites suplementados uma vez que apresenta uma intensidade superior num dos parâmetros negativos de qualidade (ranço)

e intensidade inferior em alguns parâmetros positivos de qualidade do azeite (doce e picante) quando comparado com os azeites suplementados com extrato de algas.

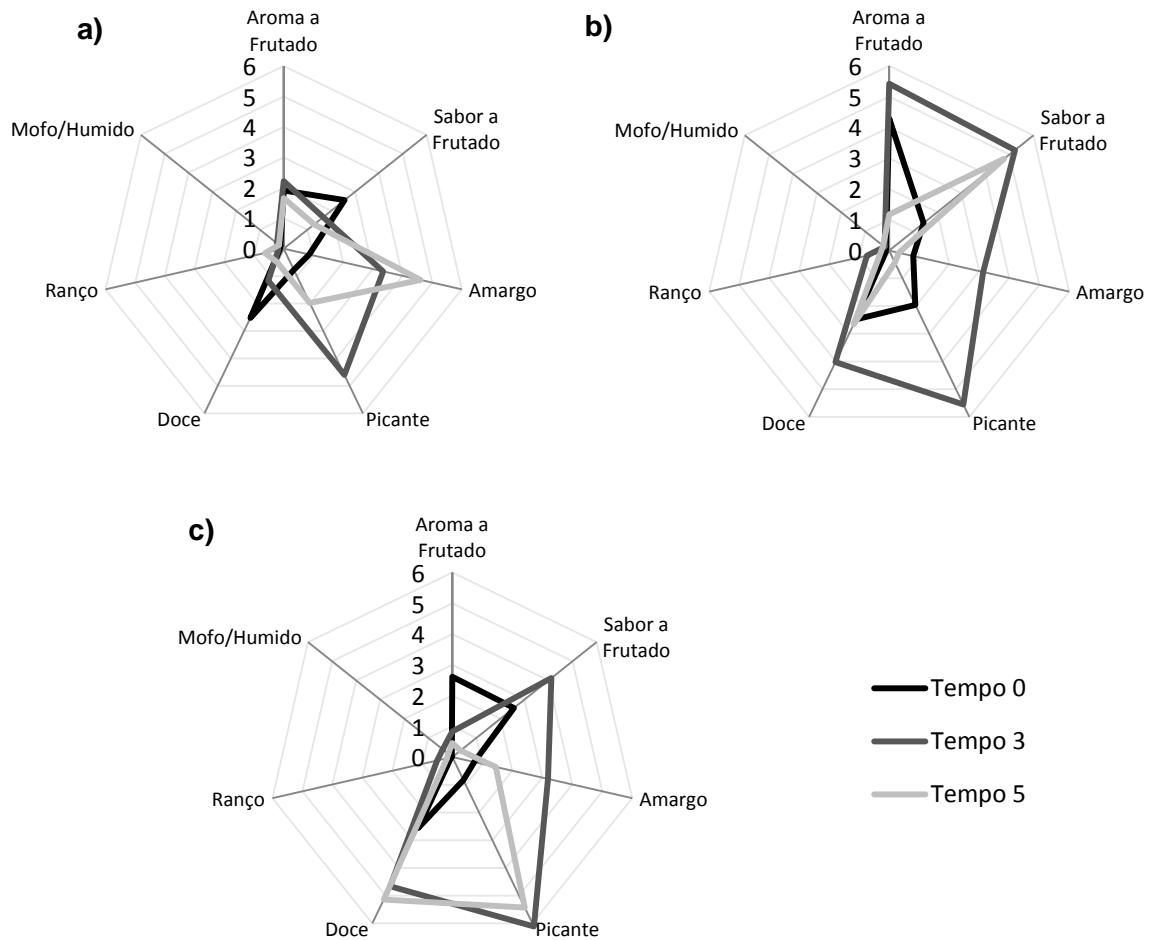


Figura 4.13 - Perfil Sensorial nos três tempos de estudo para os azeites controlo (a), azeite Kombu (b) e azeite Nori (c).

Nos azeites em geral, verifica-se que o azeite controlo (figura 4.13a) não apresenta diferenças entre os três tempos no aroma a frutado e mofo/húmido ($p > 0,05$). Ao fim de cinco meses é detetado um sabor mais amargo e rançoso e menos doce e frutado que inicialmente ($p < 0,05$). No azeite Kombu (figura 4.13b), não existem alterações nos descritores mofo/húmido, doce e ranço ($p > 0,05$) ao longo do armazenamento. Ao fim de cinco meses, em relação ao t_0 é mais evidente a diminuição do aroma a frutado e aumento do sabor a frutado ($p < 0,05$). No azeite Nori (figura 4.13c) todos os descritores apresentam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento ($p < 0,05$). Ao fim de cinco meses, em relação ao t_0 , o azeite Nori apresenta-se com menos aroma e sabor a frutado e mais doce, picante, rançoso e com sabor a mofo/húmido. ($p < 0,05$). Numa abordagem geral, verifica-se que ao t_5 (comparativamente ao t_0), para o azeite controlo,

os parâmetros positivos de qualidade diminuem (doce e sabor frutado) e um dos parâmetros negativos aumenta (ranço), para o azeite Kombu, verifica-se que os parâmetros negativos não se alteram e para o azeite Nori existe um aumento tanto de parâmetros positivos (doce, picante), como de parâmetros negativos de qualidade do azeite (ranço e mofo/húmido). Concluindo-se que o azeite controlo apresenta uma qualidade inferior comparada aos restantes azeites.

Após degustação (figura 4.14), foi analisado o flavour residual, verificando-se que no t_0 não existem diferenças entre os azeites suplementados e o azeite controlo ($p > 0,05$), no entanto no t_3 e no t_5 os azeites suplementados encontram-se distintos do azeite controlo ($p < 0,05$). Verifica-se que a adição do extrato de alga Nori favorece o flavour residual, permitindo uma maior persistência deste descritor (do t_3 para o t_5 a intensidade mantém-se praticamente constante). Já a adição do extrato de alga Kombu, não favorece o flavour residual, uma vez que o descritor diminui de intensidade no mesmo intervalo de tempo.

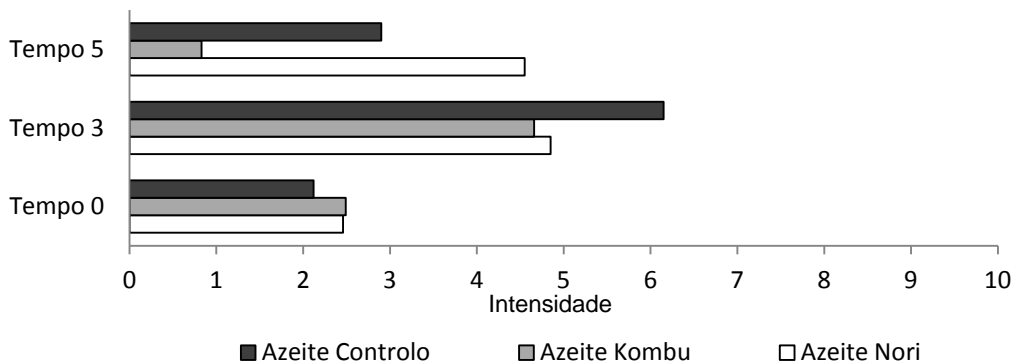


Figura 4.14 –Flavour residual para os três azeites ao longo do tempo de armazenamento.

Em paralelo com o estudo anterior, foi realizado um estudo de aceitação, em que os provadores exprimiram a sua opinião em relação aos azeites analisados.

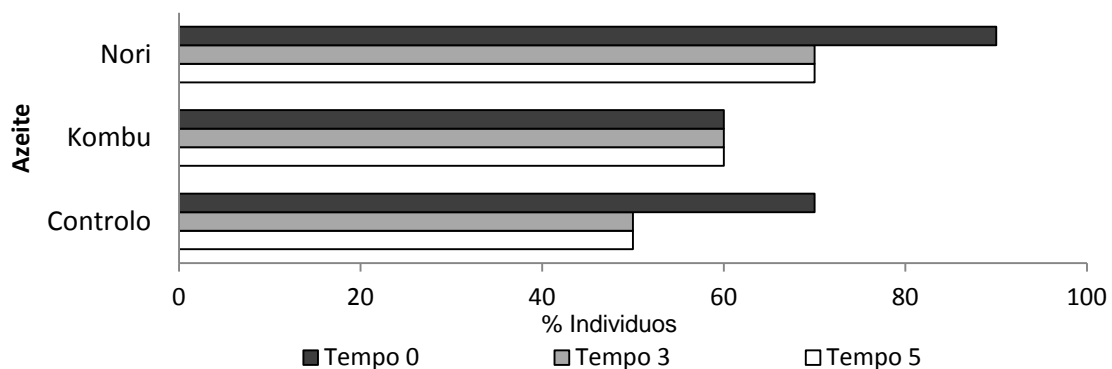


Figura 4.15 – Evolução do nível de aceitabilidade (gosta/não gosta) para as três amostras em estudo nos três tempos de análise por parte do painel de provadores.

De uma forma geral, podemos observar pela figura 4.15 que a maioria dos provadores aceitaram positivamente os três azeites em estudo, sendo o preferível o azeite suplementado Nori em todos os tempos de análise. Do tempo t_0 para o tempo t_5 , a aceitabilidade do azeite controlo diminui, do azeite Kombu mantém-se constante e a do azeite Nori diminui, no entanto este último manteve-se sempre a um nível superior de aceitabilidade relativamente aos azeites controlo e Kombu. A diminuição ao longo do tempo da aceitabilidade dos azeites indica-nos pela avaliação efetuada pelo painel de provadores que os azeites perderam atributos positivos.

No tempo final (t_5) foi realizado um teste de consumidor que teve como objetivo avaliar o grau de preferência das amostras por um grupo de provadores não treinados em termos de aceitabilidade global e preferência pelo atributo cor.

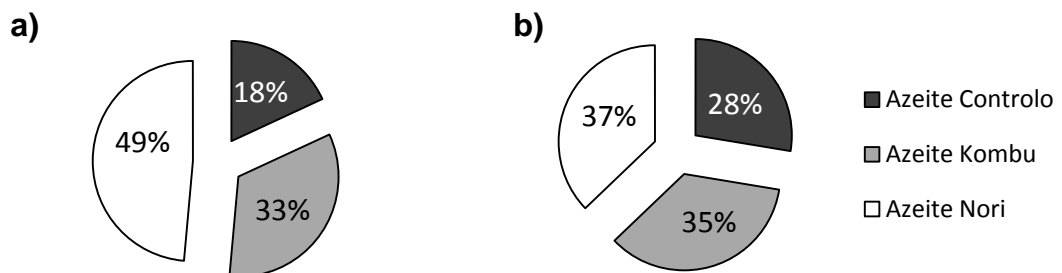


Figura 4.16 – Teste de consumidor realizado ao fim do tempo de armazenamento de forma a avaliar o grau de aceitabilidade geral (a) e preferência de cor (b) entre as três amostras.

A partir do teste de consumidores (figura 4.16) verifica-se que o azeite suplementado Nori foi o que apresentou uma preferência superior na aceitabilidade global e no atributo cor, sendo mais evidente em termos de aceitabilidade (figura 4.16a), sensivelmente metade dos consumidores têm a sua preferência neste azeite. Pelos resultados podemos inferir que há uma tendência do consumidor associar a cor como parâmetro que contribui para determinar a aceitabilidade do azeite, visto que o azeite Nori também é o preferível em termos de cor, no entanto próximo do azeite Kombu (figura 4.16b). Para verificar se existe ou não essa correlação, foi realizado o teste do qui-quadrado que indicou que não existe correlação entre as duas variáveis, aceitabilidade e cor ($p > 0,05$).

É de salientar que em comparação com o teste realizado com um painel de provadores treinado, o azeite Nori é o azeite que apresenta maior aceitabilidade por parte de ambos os provadores e daí podermos dizer que este azeite poderá ser uma boa alternativa no mercado dos azeites gourmet.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

A acidez livre e o índice de peróxidos representam dois importantes parâmetros de qualidade do azeite. Em termos de acidez, ao fim de cinco meses de armazenamento os azeites suplementados Kombu e Nori apresentam uma tendência de aumento no valor de acidez, que no entanto não é estatisticamente diferente da acidez do azeite controlo, indicando-nos que o extrato de algas não influenciou positivamente este parâmetro. No índice de peróxidos, verificou-se que não existem diferenças significativas entre os três azeites ao longo do tempo de armazenamento, o que nos indica mais uma vez que a adição do extrato de algas não contribuiu positivamente para a estabilidade dos azeites (prevenindo a oxidação). Também a absorvância (espectrofotométrica no UV) nos dá indicações de qualidade de um azeite. Verifica-se uma perda de qualidade dos mesmos pela análise a este parâmetro. Assim, a adição do extrato de algas não contribui com o seu potencial antioxidante para incrementar a estabilidade do azeite. Apesar das alterações ao longo do tempo de armazenamento, os parâmetros de qualidade que foram avaliados mantêm-se abaixo dos limites legais estabelecidos para os azeites virgem extra.

O azeite é um produto rico em ácidos gordos essenciais, com elevado teor de ácido oleico (ácido gordo insaturado) e com baixo teor em ácidos gordos saturados, o que faz com que seja um alimento com benefícios para a saúde. A adição dos extratos de algas fez com que ao fim de cinco meses de armazenamento os azeites se encontrem menos saturados e mais insaturados que o azeite controlo.

Relativamente à cor, os azeites apresentam diferenças entre si, no entanto os azeites Kombu e Nori acompanham a tendência do azeite controlo. A diferença entre azeites deve-se à migração de pigmentos lipossolúveis provenientes das algas. A concentração de clorofilas e carotenoides que são pigmentos que conferem cor ao azeite encontram-se dentro dos limites descritos na literatura. Em termos de densidade e viscosidade, verifica-se que a adição do extrato não influenciou inicialmente o primeiro parâmetro, no entanto influenciou o segundo.

Com este trabalho podemos concluir que a adição de algas na forma de extrato influencia as características do azeite no entanto não atua beneficemente na estabilidade do azeite, não atuando como antioxidante. No entanto, a adição do extrato ao azeite enriquece o produto em polifenóis, que são compostos com benefícios para a saúde do consumidor.

Em termos de perfil sensorial, podemos concluir pela análise ao longo dos três tempos de estudo, que no parâmetro negativo de qualidade do azeite - mofo/húmido - não se verifica alterações significativas entre azeites. Já para o descritor ranço verificam-se diferenças no último tempo de análise entre os azeites suplementados e o controlo. O azeite Controlo encontra-se com qualidade inferior à inicial, nomeadamente no descritor – ranço – que foi avaliado pelo painel como mais intenso e por outro lado foi avaliado como menos doce e frutado; o azeite Nori no final do tempo de armazenamento encontra-se mais doce e picante (fatores positivos no azeite) e no entanto revelou-se com menos aroma e sabor a frutado, já o azeite Kombu no final do período de armazenamento foi avaliado com um flavour mais frutado.

Conclui-se ainda que todos os azeites foram aceites positivamente por parte do painel de provadores e que tanto o estudo realizado em painel bem como pelo teste de consumidor deu como preferido o azeite Nori, considerando-se desta forma que numa situação de lançamento no mercado “gourmet” nesta área de alimentos, o azeite suplementado Nori seria uma boa alternativa.

Como perspetivas futuras seria essencial a continuação das análises por um período superior de tempo de modo a confirmar-se o prolongamento do tempo de prateleira deste produto.

Seria também interessante proceder à análise da estabilidade oxidativa das amostras pelo método de Rancimat e proceder a uma análise microbiológica ao produto de forma a avaliar-se a estabilidade microbiana do mesmo, apesar de estarmos a trabalhar com o produto microbiologicamente estável, estamos a adicionar ingredientes estranhos e que podem causar alterações a este nível na matriz do azeite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anon.,(1982). **Standard Tables of Food Composition in Japan**, Fourth Edn. Resources Council, Science and Technology Agency, Ishiyaku Publ., Inc., Tokyo
- Antoun, N; Tsimidou, M (1997), **Gourmet olive oils: stability and consumer acceptability studies**; Food research International, Vol. 30, n.º. 2, 131-136.
- AOAC, 2000. Official method of analysis 934.01 (17th Edition) Volume I. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Maryland, USA.
- AOAC, 2000. Official method of analysis 962.09 (17th Edition) Volume I. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Maryland, USA.
- Aparicio, R. (2003). **Manual del aceite de oliva**, Harwood, J., eds.; Madri Vicente, Ediciones y Mundi-prensa: Madri, 2003, cap.14.
- Aued-Pimentel, S.; Mancini-Filho, J.; Badolato, E. G. S.; Carvalho, J. B.; (1994) *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54, 69
- Ayadi, M.; Kamoun, N.; Attia, H. (2009). **Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by Tunisian aromatic plants**; Food and Chemical toxicology 47: 2613-2619.
- Baiano, A.; Gambacorta, G.; Notte, E. (2010), **Aromatization of olive Oil**; Transworld research network, 37/661 (2), Fort P.O.Trivandrum-695 023 Índia
- Bilancia M.T., Caponio F., Sikorska E., Pasqualone A., Summo C.,(2007). **Correlation of triacylglycerol oligopolymers and oxidised triacylglycerols to quality parameters in extra virgin olive oil during storage**. *Food Res. Intern.*, 40: 855-861.
- Bligh, E. G; Dyer, E. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification**. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911
- Boskou, D. (1998). **Química y Tecnología del Aceite de Oliva**. AMV Ediciones, Madrid, 67-104; 125-164. ISBN: 84-89922-06-3.
- Boskou, D. (2007). **Olive Oil**. In *More on Mediterranean Diets (World Review of Nutrition and Dietetics, Vol. 97)*. Ed. Simopoulos, A. P. & Visioli, F.; Karger, Basel, 180-181. ISBN: 3805582196.
- Boukhari & Sophie (1998). **Anyone for algae?** UNESCO Courier 51(7/8): 31-32.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer**. *Life Sciences*, 74, 2157–2184.
- Carraco Pancorbo, et. al (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.
- Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G., Bilaloglu, R. (2009). **Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of Codium tomentosum Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro**. *Food and Chemical Toxicology*. 47:796-801
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. 2008. **Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia**. *LWT – Food Science and Technology*. 41:1067–1072.

- Cho, M; Lee, H; Kang, I; Won, M; You, S (2011), **Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed.** Food Chemistry, 127: 999–1006.
- COI – International Olive Council. **Trade Standard Applying to Olive Oils and Olivepomace Oils.** COI / T.15 / NC no. 3 / Rev. 3, November 2008.
- Cornish, M.L.; Garbary, D.J. (2010) **Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition.** *Algae*, 25, 155–171.
- Covas, M (2007), **Olive oil and the cardiovascular system**, Pharmacological Research 55: 175–186.
- Dekhili, S; Sirieix, L; Cohen, E (2011), **How consumers choose olive oil: The importance of origin cues**, Food Quality and Preference 22: 757–762.
- Duan, X.J., W.W. Zhang, X.M. Li, B.G. Wang, (2006), **Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*.** Food Chem., 95: 37-43.
- 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.
- Duffy, CF; Power, RF (2001). **Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts.** *Int J of Antimicrobial Agents* 17 : 527-529.
- Earle, M (1997), **Innovation in the food industry**, Trends in Food Science & Technology Vol. 81.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. e Cava, R. (2007). **Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté**, LWT, nº40, pp. 58-65.
- Fiorino, P. (1996). “**Enciclopedia Mundial da Oliveira**”. Conselho Oleícola Internacional. Madrid. Pag. 199.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) – disponível em <http://www.fao.org> [acedido a 13/04/2012]
- Frankel, E. N. (1998). **Free radical oxidation, in Lipid Oxidation.** Frankel, E. N., Ed., The Oily Press Dundee Ltd., Scotland.
- Fuller, W. G. (2005). **New Product Development – From Concept to Marketplace.** 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, 1-10. ISBN: 0-8493-1673-1.
- Gandulas-Rojas, B; Mínguez-Mosquera, M.I (1996), **Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various spanish olive varieties.** Journal of the Science of Food and Agriculture. 72: 31-39.
- Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M. e Morcuende, D. (2010). **Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties**, J. Agricultural and Food Chemistry, nº58, pp. 8854-8861.

- Giuffrida, D; Salvo, F; Salvo, A; Pera, L; Dugo, G (2007), **Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties**, Food Chemistry 101: 833–837.
- Gouveia, J. M. B. (1995). **Azeites Virgens do Alto Alentejo – Comportamento Químico, Tecnológico e Sensorial**. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- 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.
- Gross, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 75-254.
- Guiry, M.D. e Blunden, G. (1991) **Seaweed resources in Europe: uses and potential**. Wiley, Chichester, xi, 432 pp.
- 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.
- Heinonen, M 2007 **Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective**. Review, Mol Nutr Food Res 51:684 – 691
- Huang, L; Bauer S, (2008), **Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health**, American College of Surgeons 407-416.
- Huie, R. E. & Neta, P. (2002) **Chemistry of Reactive Oxygen Species. In: Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach**. Kluwer Academic Publishers, New York, 33-63.
- International Olive Council – disponível em <http://www.internationaloliveoil.org> [acedido a 22/012012]
- Ismail, A, Hong, T, (2002), **Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds**, Mal J Nutr, 8(2), 167-177.
- ISO 11035:1994 **Sensory analyses – Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach**.
- ISO 11036:1994 **Sensory analyses – Methodology – Texture profile**.
- ISO 4121:1987 **Sensory analyses – Methodology – Evaluation of food products by methods using scales**.
- ISO 6658:1985 **Sensory analyses – methodology – general guidance**.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010). **Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans**. Czech Journal of Food Sciences. 28, 206–212.

- Jorge, R. (2010). **Caracterização de azeites virgem extra “gourmet” variedades e “Blends” comercializados no mercado do Rio Grande do Sul**. Dissertação para obtenção de grau de doutor. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Rio Grande do Sul, Brasil
- Jormalainem, V. e Honkanen, T. 2004. **Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus***. *J. Evol. Biol.* 17:807-820.
- Kalua CM., Allen MS., Bedgood Jr DR., Bishop AG., Prenzler PD., Robards K. (2007), **Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review**, *Food Chemistry* 100, 273–286.
- Kim, N.H.; Kim, J.H.; Lee, S.; Lee, H.; Yoon, J.W.; Wang, R.; Yoo, S.H. (2010) Combined effect of autoclaving-cooling and cross-linking treatments of normal corn starch on the resistant starch formation and physicochemical properties. **Starch/Stärke**, v. 62, p. 358-363, 2010.
- Kiritsakis, A (1998). **Olive oil: From the tree to the table**. Second Edition Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, 006611, USA.
- Kiritsakis, A. K. (1992). **El Aceite de Oliva**. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid, 45-76; 77-82; 83-102; 131-156; 157-162; 163-180, ISBN: 84-87440-28-2.
- Kiritsakis, A; Christie, W. W. (2000). **Analysis of Edible Oils**. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 129-158. ISBN: 0-8342-1633-7.
- Kiritsakis, A; Markakis, P (1987). **Olive Oil: A Review**. In Advances in Food Research. Ed. Chichester, C.O.; Academic Press Inc., San Diego, 453-472. ISBN: 0-1201- 6431-.
- Kiritsakis, K.; Kyritsakis, A.; Mavroudi, N. (2001). **Fats and Oils**. In The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion. Ed. Matalas, A.-L.; Zampelas, A.; Stavrinos, V.; Wolinsky, I.; CRC Press, Boca Raton, 77-96. ISBN: 0-8493-0110-6.
- Kochhar, S. P. (1993). **Oxidative Pathways to the Formation of Off-Flavours**. In Food taints and off-flavours. Ed. Saxby, M. J.; Chapman & Hall, London, 168-225. ISBN: 0-7514- 0263-X.
- Kris-Etherton P. (1999) **Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease**. *Circulation*. 100, 1253–1258.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). **Review - Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges**. *Prog Lipid Res.*, 46, 244–282.
- Levring, T., Hoppe, H; Schmid, O. (1969). **Marine Algae. A survey of Research and Utilization**. Cram, De Gruyter and Co., Hamburg, Germany.
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2007) **Industrias Alimentares. Aditivos e Tecnologia**. Escolar Editora, Portugal (ISBN 978-972-592-203-3)
- Lombrana, I; Izgara, J. (1996), **Experimental estimation of effective transports coefficients in freeze drying for simulation and optimization purposes**, *Drying Technology*, 14(3), pp 743-763.

- López-Lopez, L., et al. (2009), **Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds**, Meat Science 83, 492–498.
- Lüning, K. (1990). **Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology**. Wiley and Sons, New York.
- Mailer, R; Beckingham, C; (2006), **Testing olive oil quality: chemical and sensory methods**. Primefact 231.
- March, L. e Rios, A. (1989). **El Libro del Aceite y la Aceituna**. Alianza Editorial, S. A., Madrid, 167-173. ISBN: 8-4206-0433-X.
- McHugh, D (2003) **A Guide to the seaweeds industry**. FAO Fisheries Technical Paper No. 441 ISBN 92-5-104958-0
- Mello, J. P. C.; Santos, S. C. (2001) **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Porto Alegre; 3ª ed.,
- Mínguez-Mosquera, M.; Garrido-Fernandez, J (1989), **Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (Olea europaea)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry.40: 60-63.
- Monguez-Mosquera, et.al (1991), **Color Pigment Correlation in Virgin Olive Oil**, Journal of the American Oil Chemists' Society 68, 332-336.
- Morales, M. A. & Przybylski, R. (2000). **Olive Oil Oxidation**. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 459-490. ISBN: 0-8342-1633-7.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R., & Watamaba, T. (1987). **The main seaweeds food in Japan**. Hydrobiologia, 151/152, 5–29.
- Nollet, Leo M. L. e Toldrá, Fidel (2010). **Handbook of seafood and seafood products analysis**, CRC Press, pp. 69-120, 189-214, 309-326, 395-424.
- Norma Portuguesa 4488:2009. **Produtos da pesca e da aquicultura Determinação do teor de azoto total e cálculo do teor de proteína bruta**
- O'Brien, R. D. (2009). **Fats and Oils Formulating and Processing for Applications**. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, 166-167. ISBN: 1-42006-166-6.
- Oohusa, T. (1993). **The cultivation of Porphyra "nori"**. pp. 57-73. In Ohno & Critchley, q.v.
- Panreac Química (1999). **Analíticos en Alimentaria – Metodos Oficiales de Analisis –Aceites y grasas**. Panreac Quimica, S. A. Centre Telematic Editorial. Pag. 12-16.
- Paraskevopoulou, D.; Boskou, D.; Paraskevopoulou, A. (2007), **Oxidative stability of olive oil–lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides**; Food Chemistry 101: 1197–1204.
- Perrin, J. L. (1992). **Les Composés Mineurs et les Antioxygènes Naturels de l'Olive et de son Huile**. Revue Française des Corps Gras, 39 (1/2): 25-32.
- Pinteus, S., (2011), **Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com**

elevado potencial biotecnológico. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, ESTM, IPL

Prabhasankas, P; et al. (2009) **Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta:Chemical, functional and structural evaluation**, Food Chemistry 115: 501–508

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) **Standardized Methods for the Determination of antioxidant Capacity and phenolics in Foods and Dietary Supplements.** J Agric Food Chem 53:4290-4302

Ramalho, V. e Jorge, N. (2006). **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos**, Quim. Nova, Vol.29, Nº.4, pp. 755-760.

Ranalli, A., Ferrante, M.L., De Mattia, G. e Costantini, N. (1999). **Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction.** Journal of Agriculture and Food Chemistry 47:417-424.

Ratti, C. (2001). **Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review**, Journal of Food Science, 36, pp 705.

Regulamento (CE) n.º 1019/2002 da Comissão de 13 de Junho de 2002 **relativo às normas de comercialização do azeite.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L155, 14 de Junho de 2002.

Regulamento (CE) N.º 640/2008 da Comissão de 4 de Julho de 2008 **que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados** Jornal Oficial da União Europeia, L178, 5 de Julho de 2008

Regulamento (CE) n.º 865/2004 do Conselho de 29 de Abril de 2004, **relativo à organização comum de mercado no sector do azeite e da azeitona de mesa e que altera o Regulamento (CEE) n.º 827/68.** Jornal Oficial da União Europeia, L206, 9 de Junho de 2004.

Regulamento (CE) n.º 702/2007 da Comissão de 21 de Junho de 2007, **que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.** Jornal Oficial da União Europeia, L161, 22 de Junho de 2007.

Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, **relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L248, 5 de Setembro de 1991.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). **Antioxidant properties of phenolic compounds.** Trends Plant Sci., 2, 152–159.

Ryan, D; Robards, K. & Lavee S. (1998). **Evaluación de la calidad del aceite de oliva.** Olivae, revista do Conselho Oleícola Internacional, Madrid, nº 72: 23-39.

Samir, M (2002) **Revista da casa do azeite**, Numero 1, Outubro 2002.

Santos, M. (2009). **A influência da utilização de gás inerte na estabilidade oxidativa dos azeites virgens nos depósitos de armazenamento.** Dissertação para

obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Tecnologia dos Produtos Vegetais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005). ***Dietary polyphenols and the prevention of diseases***. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:287-306.

Schaich, K. M. ***Industrial Oil and Fat Products***, 6. ed. New York: John Wiley and Sons, 2005.

Shahidi, F; Zhong, Y (2005), ***Lipid Oxidation: Measurement Methods***, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume.

Siddique, B; Ahmad, A; Ibrahim, M; Hena, S; Rafatullah, M; Omar, M, (2010). ***Physico-chemical properties of blends of palm olein with other vegetable oils***. *Grasas y Aceites*, 61 (4), 423-429.

Silva, R. A.; Petter, C. O.; Schneider, I. A.H. (2007) ***Avaliação da perda da coloração artificial de agatas***. REM: R.Esc.Minas, v.60, n.3, p.477-482.

Trautwein E.A., Rieckhoff D., Kunath-Rau A., Erbersdobler H.F. (1999) ***Replacing saturated fat with PUFA-rich (sunflower oil) or MUFA-rich (rapeseed, olive and high-oleic sunflower oil) fats resulted in comparable hypocholesterolemic effects in cholesterol-fed hamsters***. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 43, 159–172.

Tseng, C.K. (1987). ***Laminaria mariculture in China***. pp. 239-263. In FAO, 1987b.

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

Villalta, L. (1999). ***Obtención del aceite de oliva virgen*** – 2ª Edição, Editorial Agrícola Española, S.A.. Madrid.

Wang, F, Kang, S, Pan, C, Wu, S (2011). ***Composition of two seaweed-oligosaccharide-lysates derived from agarase as-ii and their ferrous-chelating antioxidant power***, *Journal of Marine Science and Technology*, Vol. 19, No. 5, pp. 557-564.

Willet, W.C., et al. (1995), ***Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating***, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61,1402.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. (2002). ***Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1619-1624.

Zar J H (2009) ***Biostatistical Analysis***. Prentice-Hall International, Inc. London, 5th ed.

Zheng, W., Wang, S. I., (2001). ***Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs***. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

Zubia, M.; Robledo, D.; Freile-Pelegrin, Y. (2007) ***Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico***. *J. Appl. Phycol.*, 19, 449–458.

7. ANEXOS

Anexo I – Condições de Operação do Cromatografo gasoso.

Tabela 7.1 – Condições de operação utilizadas para a análise ao perfil lipídico por GC.

Forno	Temp ^a . Inicial = 60°C, 1 min. 1 ^a Rampa: aumentar 15°C/min até 150°C e manter por 1 min. 2 ^a Rampa: aumentar 5°C/min até 220°C e manter por 10 min.
Injetor	Temperatura = 250°C Modo: splitless.
Amostra	Volume injetado = 1µl Gás de arraste: hélio com um caudal de 1,5ml/min.
Detetor	Temperatura = 260°C. Caudal de ar: 350ml/min. Caudal de hidrogénio: 355ml/min.
Tempo de análise	35 minutos

Anexo II – Resultados da caracterização química do azeite virgem extra utilizado como base.

Tabela 7.2 – Caracterização química do azeite virgem extra. Valores em médias \pm DP.

Parâmetro	Azeite Controlo
Acidez (% ácido oleico)	0,31 \pm 0,00
Índice de Peróxidos (meq oxigénio/Kg)	14,08 \pm 0,21
K ₂₃₂ /K ₂₃₂ inicial	1 \pm 1
K ₂₇₀ /K ₂₇₀ inicial	1 \pm 1
Δ K	0,004 \pm 0,000
Viscosidade (mPa)	172 \pm 0,00
Densidade (g/ml)	0,91 \pm 0,00
Acido gordo C16:0 (%)	17,57 \pm 0,04
Ácidos gordos C 18:0 / C 18:1 n9 / C 18:1 n7 / 18:2 n6 (%)	77,19 \pm 0,18
L*	30,41 \pm 0,00
a*	0,81 \pm 0,00
b*	15,03 \pm 0,00
Clorofilas (mg/Kg)	3,48 \pm 0,01
Carotenoides (mg/Kg)	2,14 \pm 0,00
Polifenóis totais (mg EAG/g)	0,06 \pm 0,00
Capacidade de redução do radical DPPH (%)	88,29 \pm 0,04

Anexo III - Tabela de percentagens de ácidos gordos presentes ao longo do tempo de armazenamento para os três azeites em estudo.

Tabela 7.3 – Resultados percentuais de ácidos gordos nos três azeites em estudo nos cinco tempos de análise.

Ácidos Gordos	Azeite	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		Tempo 4		Tempo 5	
		Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)
C 16:0 (ácido palmítico)	Azeite Controlo	14,970	0,070	15,390	0,468	15,350	0,254	16,160	0,219	16,172	0,057	14,920	0,303
C 16:2 n4 (ácido 9,12-cis-hexadecadiónico)		0,447	0,087	0,803	0,144	0,537	0,172	0,313	0,023	0,480	0,157	0,260	0,053
C 18:0 / C 18:1 n9 / C 18:1 n7 / 18:2 n6 (ácido esteárico / ácido oleico / ácido vacénico / ácido linoleico)		81,760	0,385	80,707	0,555	81,230	0,219	81,023	0,485	80,648	0,588	76,577	0,519
C 18:3 n3 + n4 (ácido alfa linoleico e ácido octadecatriénico)		1,300	0,225	1,103	0,050	1,360	1,051	0,990	0,209	1,017	0,405	7,030	2,073
C 18:4 n3 (ácido estearidónico)		0,673	0,040	0,997	0,164	1,043	0,081	0,683	0,015	0,713	0,199	0,583	0,197
C 20:4 n6 e n3 (ácido araquidónico e ácido eicosatetraenoico)		0,853	0,087	1,000	0,105	0,977	0,051	0,823	0,127	0,970	0,145	0,627	0,075
C 16:0 (ácido palmítico)		Azeite Kombu	15,113	0,381	14,250	0,200	14,683	0,329	14,393	0,125	14,347	0,125	12,067
C 16:2 n4 (ácido 9,12-cis-hexadecadiónico)	-		-	0,577	0,231	0,610	0,219	0,313	0,040	0,457	0,064	0,207	0,006
C 18:0 / C 18:1 n9 / C 18:1 n7 / 18:2 n6 (ácido esteárico / ácido oleico / ácido vacénico / ácido linoleico)	81,577		1,529	81,693	0,163	81,917	0,160	82,807	0,252	83,090	0,271	81,063	0,330

Anexo III (Cont.) - Tabela de percentagens de ácidos gordos presentes ao longo do tempo de armazenamento para os três azeites em estudo.

Tabela 7.3 (continuação) – Resultados percentuais de ácidos gordos nos três azeites em estudo nos cinco tempos de análise.

Ácidos Gordos	Azeite	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		Tempo 4		Tempo 5	
		Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)
C 18:3 n3 + n4 (ácido alfa linoleico e o ácido octadecatriénico)	Azeite Kombu	2,137	1,252	1,007	0,307	0,787	0,346	0,710	0,193	0,613	0,247	5,470	0,310
C 18:4 n3 (ácido estearidônico)		1,177	0,260	0,118	0,205	0,850	0,204	0,703	0,023	0,646	0,116	0,527	0,006
C 20:4 n6 e n3 (ácido araquidônico e ácido eicosatetraenoico)		-	-	1,190	0,115	1,150	0,098	1,080	0,401	0,847	0,031	0,667	0,025
C 16:0 ácido palmítico	Azeite Nori	15,863	0,846	14,840	0,257	15,483	0,357	15,353	0,287	15,326	0,162	12,525	0,163
C 16:2 n4 (ácido 9,12-cis-hexadecadiónico)		-	-	1,093	0,811	0,490	0,241	0,393	0,035	0,377	0,015	0,210	0,000
C 18:0 / C 18:1 n9 / C 18:1 n7 / 18:2 n6 (ácido esteárico / ácido oleico / ácido vacénico / ácido linoleico)		79,997	0,462	80,770	0,644	81,157	0,573	81,543	0,485	81,804	0,144	80,120	0,438
C 18:3 n3 + n4 (ácido alfa linoleico e ácido octadecatriénico)		3,083	1,199	1,273	0,248	0,990	0,326	0,963	0,139	0,960	0,165	5,873	0,569
C 18:4 n3 (ácido estearidônico)		1,057	0,206	0,927	0,323	0,900	0,151	0,780	0,036	0,603	0,131	0,600	0,014
C 20:4 n6 e n3 (ácido araquidônico e ácido eicosatetraenoico)		-	-	1,097	0,219	0,973	0,203	0,967	0,050	0,930	0,105	0,645	0,007

Anexo IV – Cromatograma Padrão

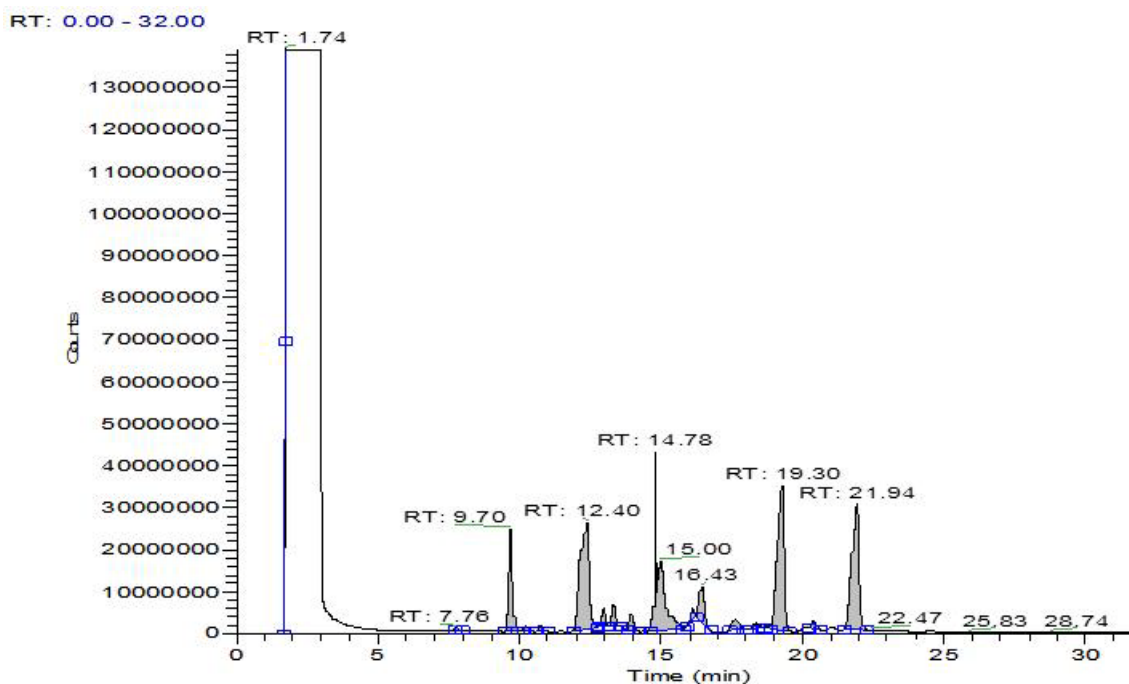


Figura 7.1 - Cromatograma Padrão para a coluna cromatográfica utilizada.

Tabela 7.4 – Tabela com a indicação da correspondência entre a área do pico e o respectivo ácido gordo.

Apex RT	Start RT	End RT	Area	%Area	Height	%Height	Acido Gordo
1,74	1,69	1,76	1,71E+08	6,07	95464722	33,44	
7,76	7,71	7,94	4017490	0,14	727707,8	0,25	C 12:0
9,7	9,49	9,96	2,28E+08	8,08	24319411	8,52	C 14:0
10,23	10,12	10,53	13325878	0,47	978073,4	0,34	
10,73	10,61	10,96	13846391	0,49	1369180	0,48	
12,4	11,89	12,73	5,55E+08	19,65	25436206	8,91	C 16:0
13	12,78	13,15	45532302	1,61	4544726	1,59	C 16:1 n7
13,35	13,16	13,55	58430020	2,07	5434250	1,9	C 16:2 n4
13,96	13,82	14,2	35002783	1,24	3741625	1,31	C 16:3 n4
14,78	14,58	15,78	4,22E+08	14,95	42722374	14,96	C 18:0 / C 18:1 n9 / C 18:1 n7 / 18:2 n6
16,12	15,9	16,23	25693653	0,91	2778777	0,97	C 18:3 n3 + n4
16,47	16,26	16,73	1,05E+08	3,72	8544188	2,99	C 18:4 n3
17,6	17,39	17,98	42634228	1,51	2327866	0,82	C 20:1 n9
18,36	18,14	18,62	19271787	0,68	1250551	0,44	C 20:4 n6 e n3
19,3	18,85	19,53	5,48E+08	19,39	34488871	12,08	C 20:5 n3
20,4	20,26	20,62	19237305	0,68	1671198	0,59	C 22:5 n3
21,94	21,5	22,26	5,18E+08	18,33	29692789	10,4	C 22:6 n3

Anexo V – Exemplo (um de três realizados) de Cromatograma para os três azeites em estudo ao longo do tempo de armazenamento

- Tempo Zero (após produção)

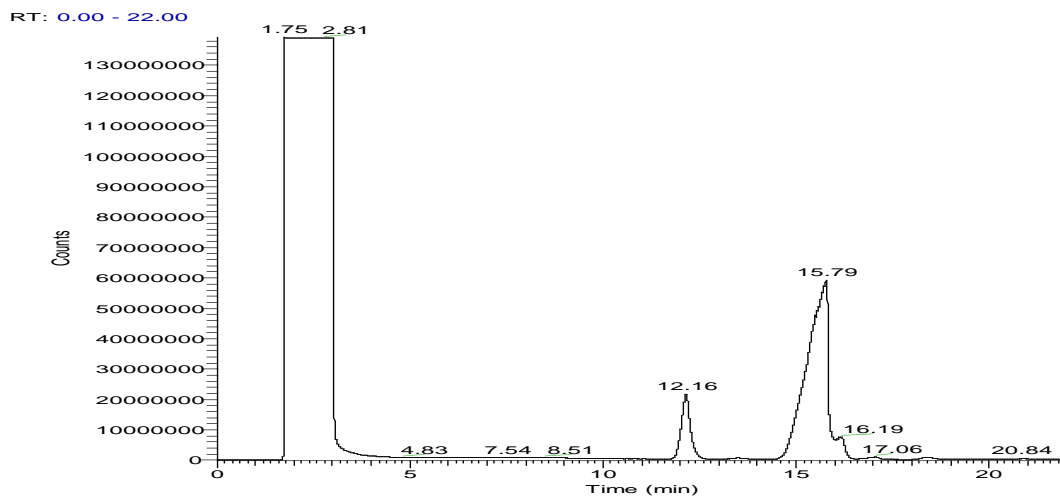


Figura 7.2 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

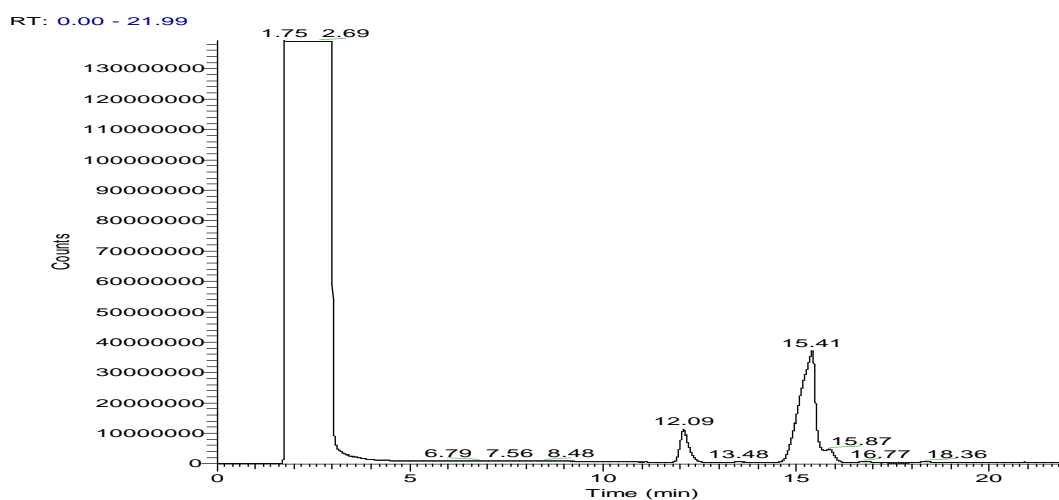


Figura 7.3 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

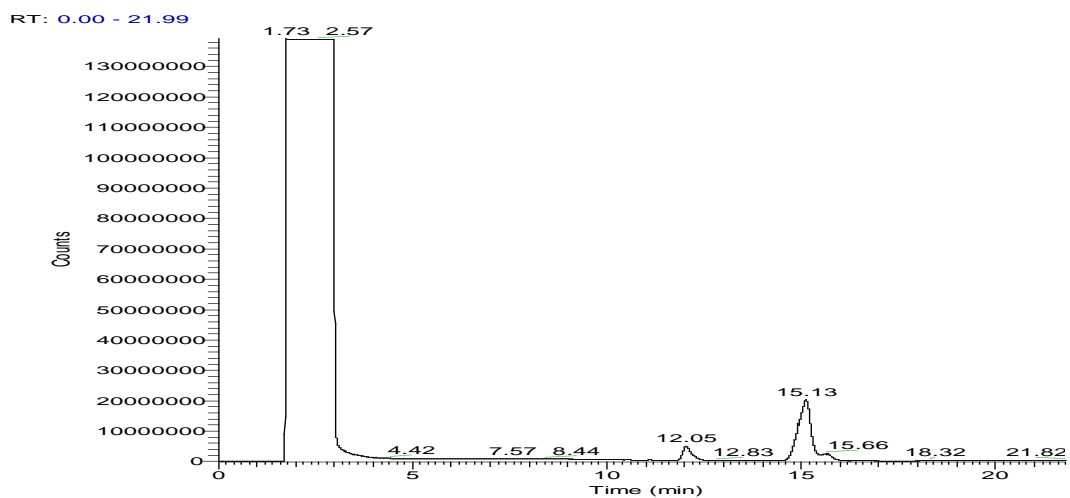


Figura 7.4 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

- Tempo Um (Um mês após produção)

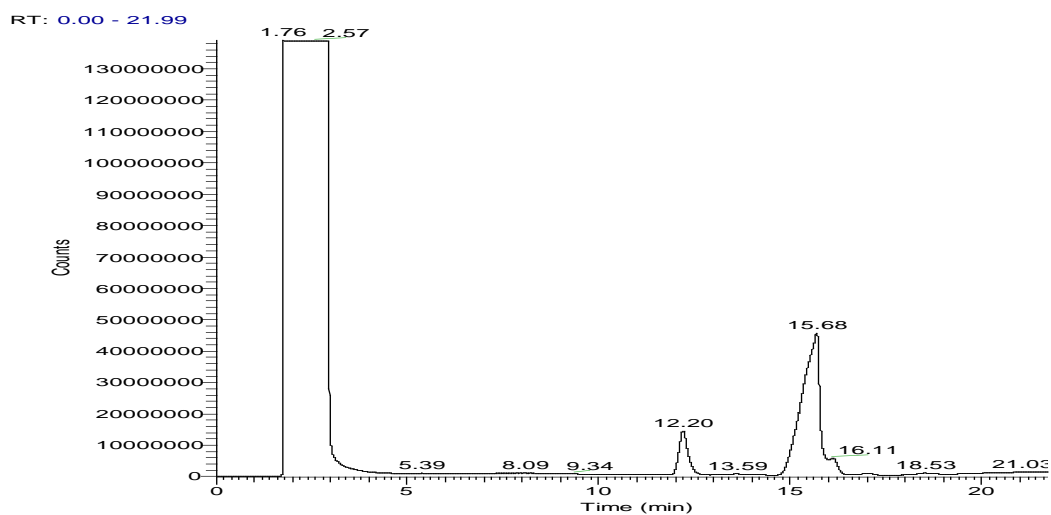


Figura 7.5 – Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

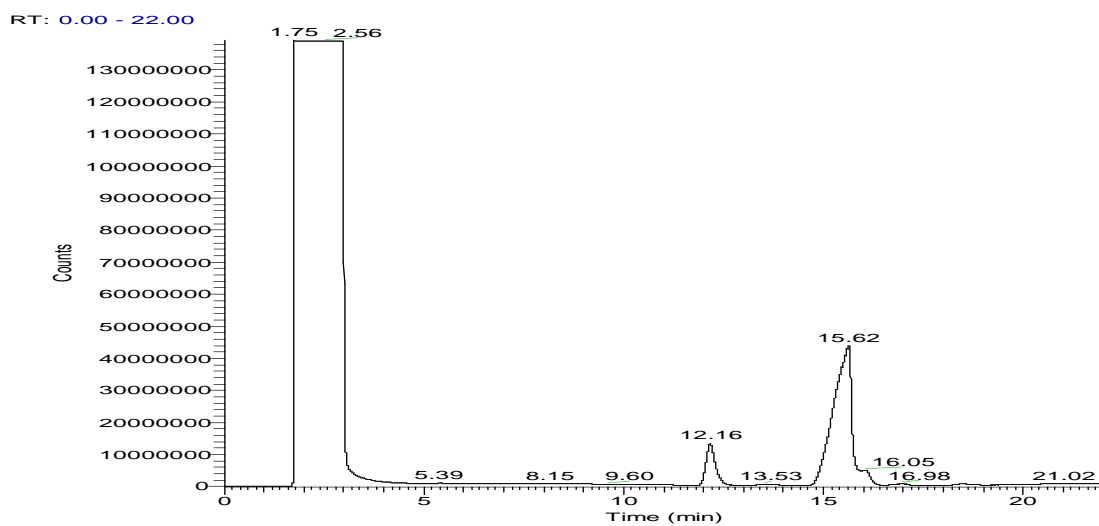


Figura 7.6 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

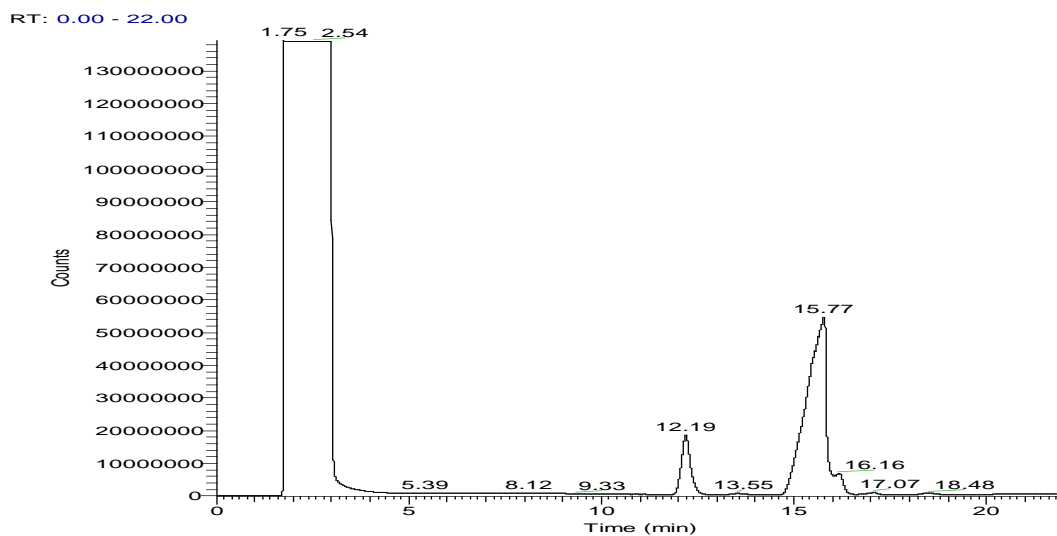


Figura 7.7 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

- Tempo 2 (Dois meses após produção)

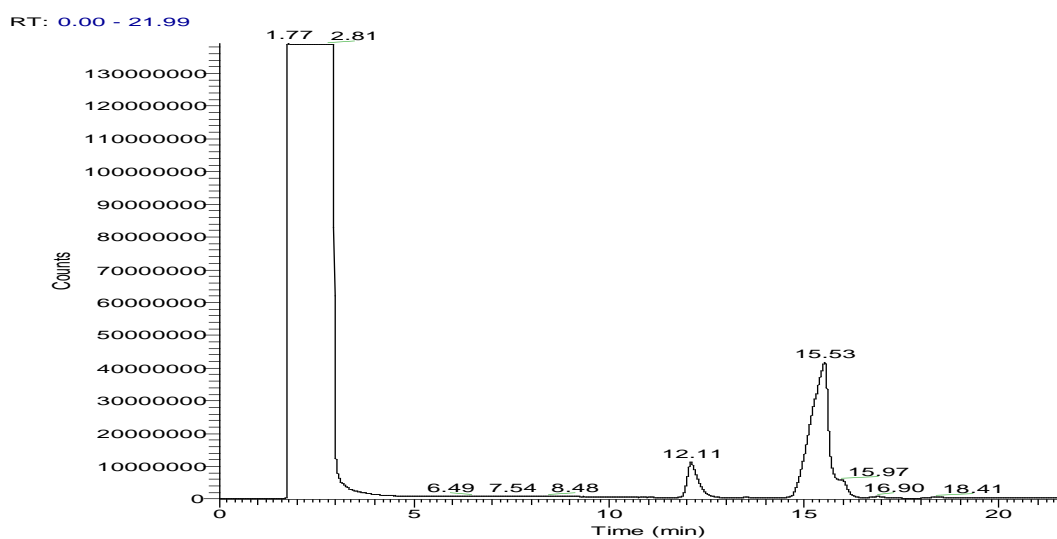


Figura 7.8 – Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

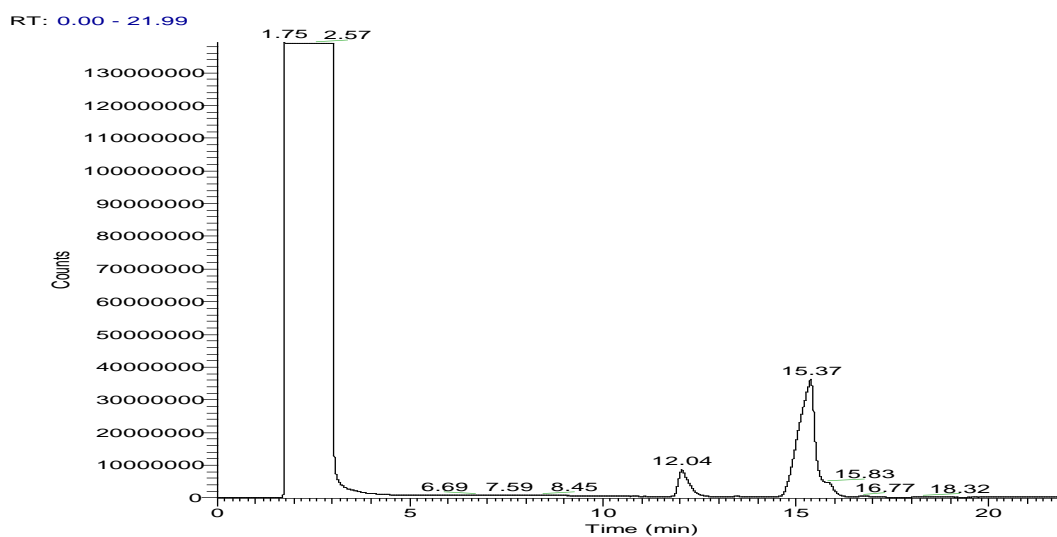


Figura 7.9 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

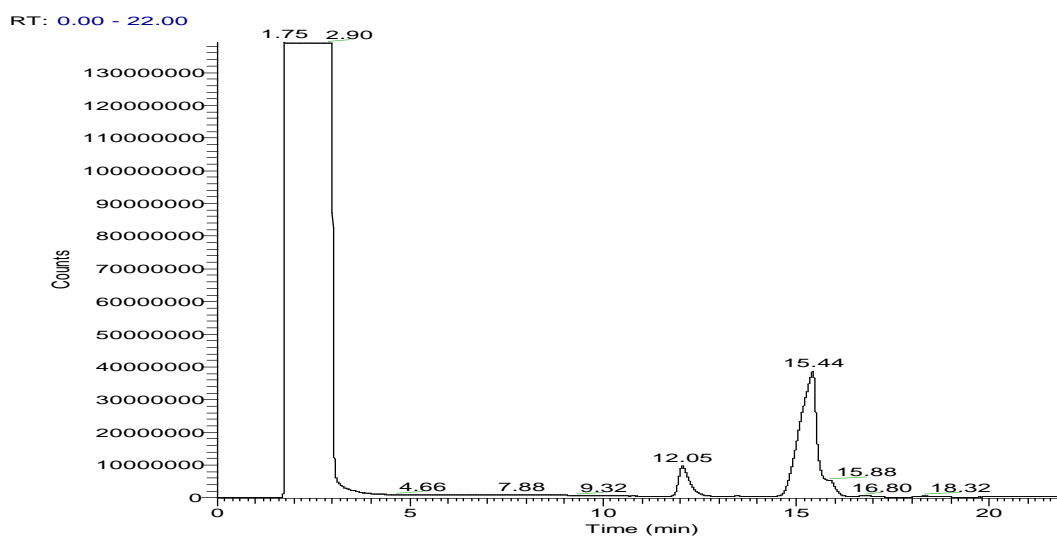


Figura 7.10 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

- Tempo Três (Três meses após produção)

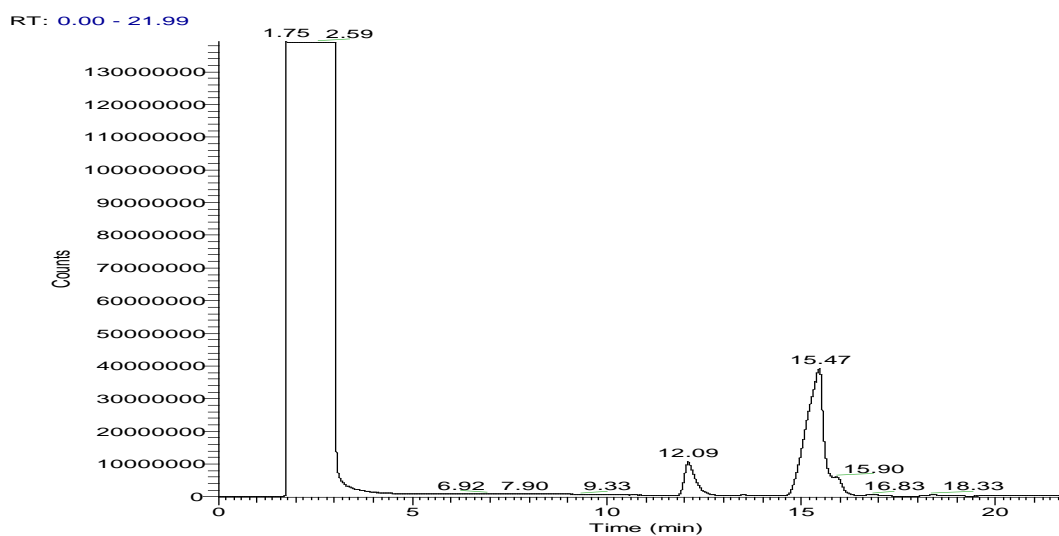


Figura 7.11 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

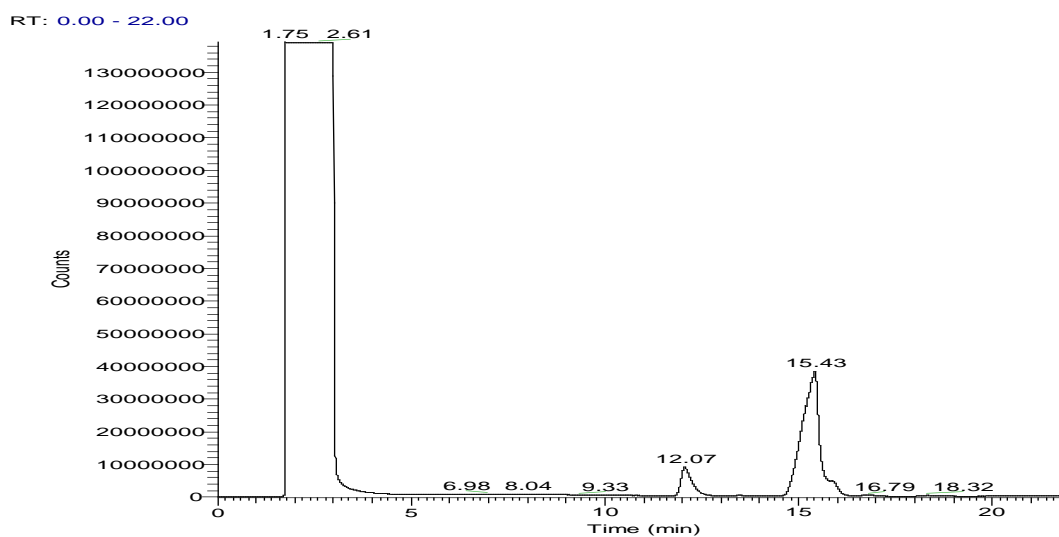


Figura 7.12 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

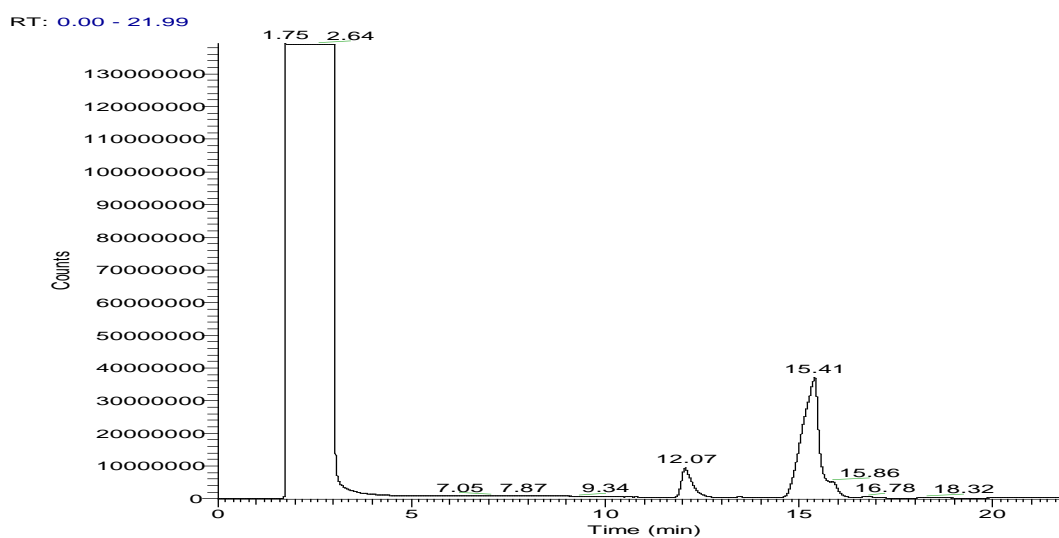


Figura 7.13 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

- Tempo Quatro (Quatro meses após produção)

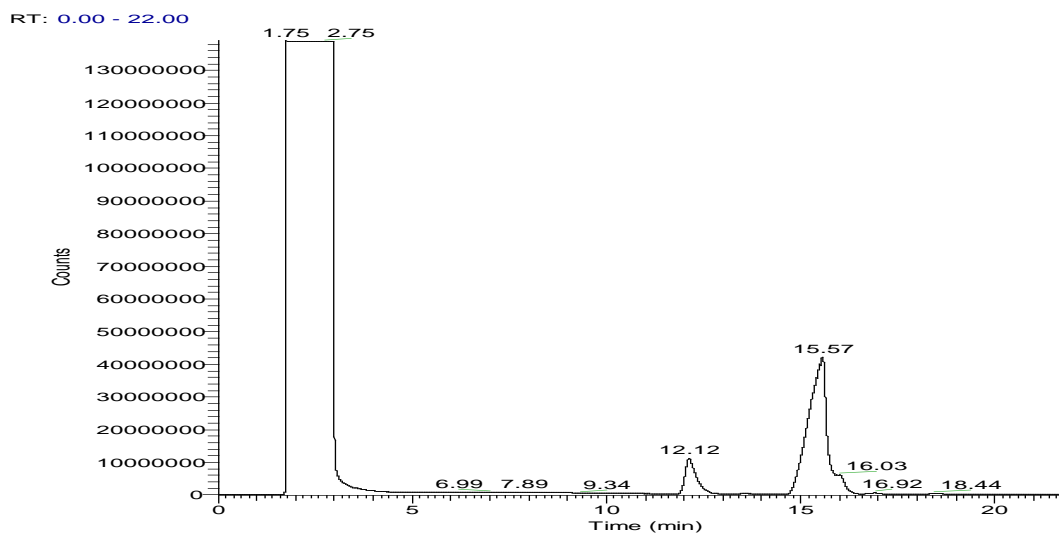


Figura 7.14 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

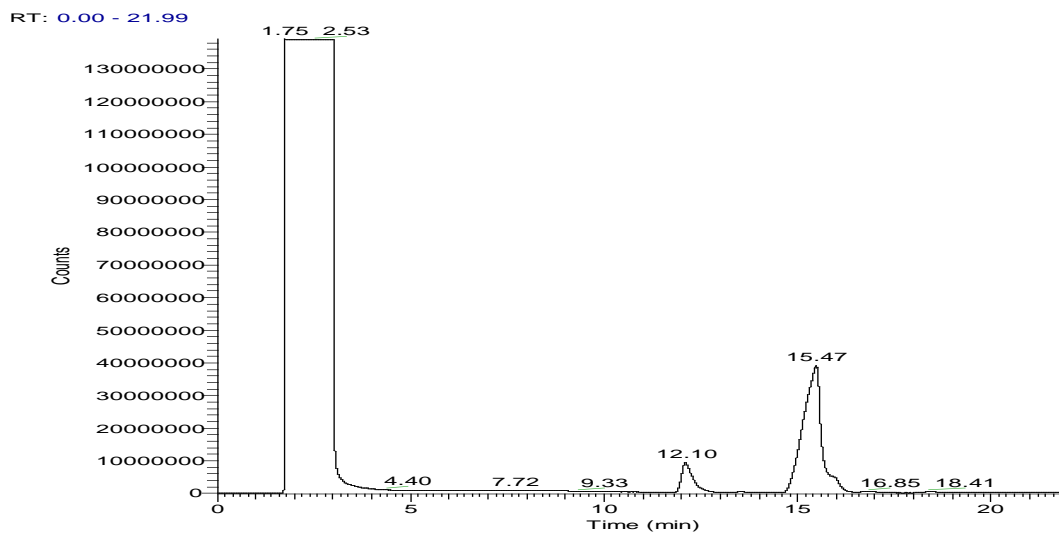


Figura 7.15 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

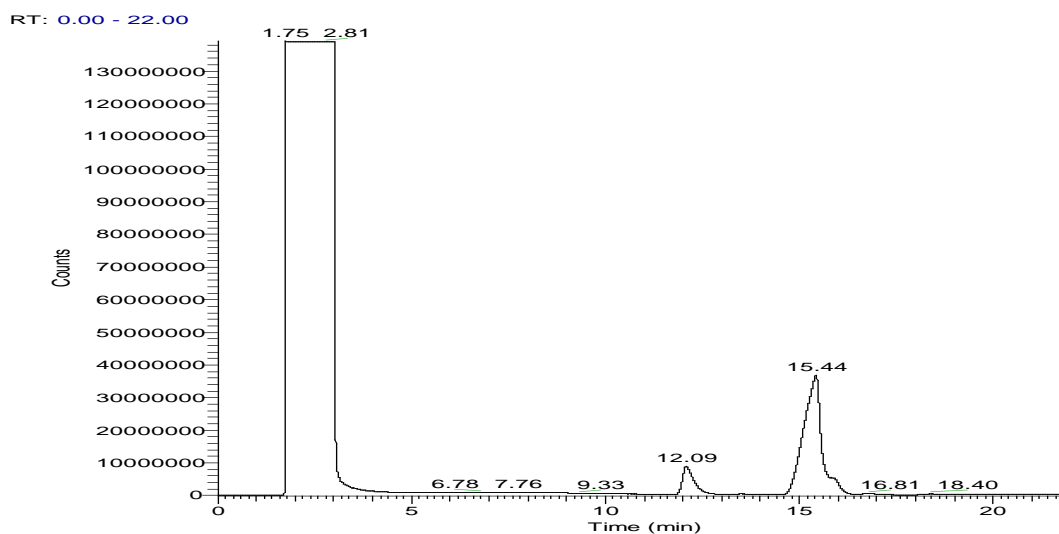


Figura 7.16 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

- Tempo Cinco (Cinco meses após produção)

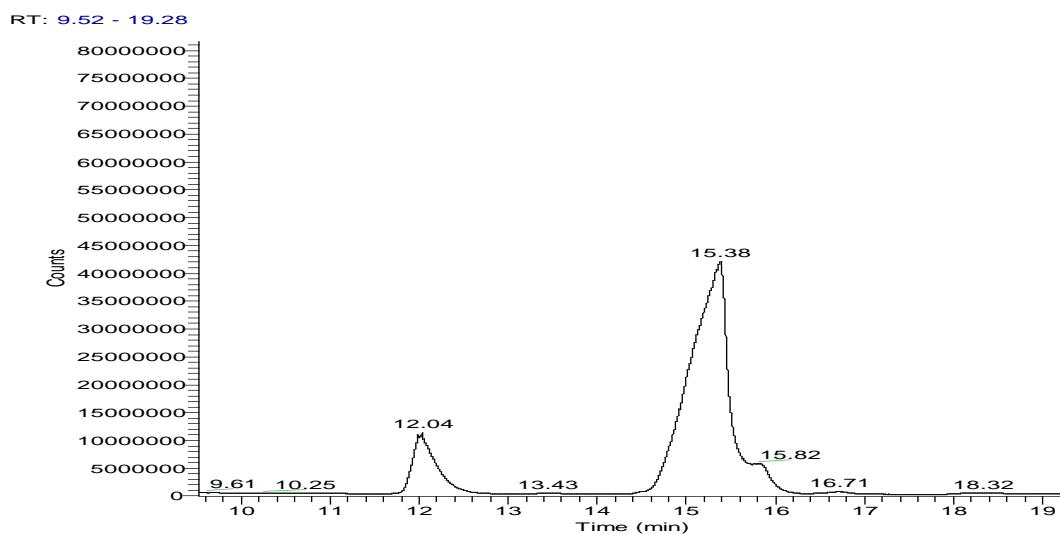


Figura 7.17 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Controlo.

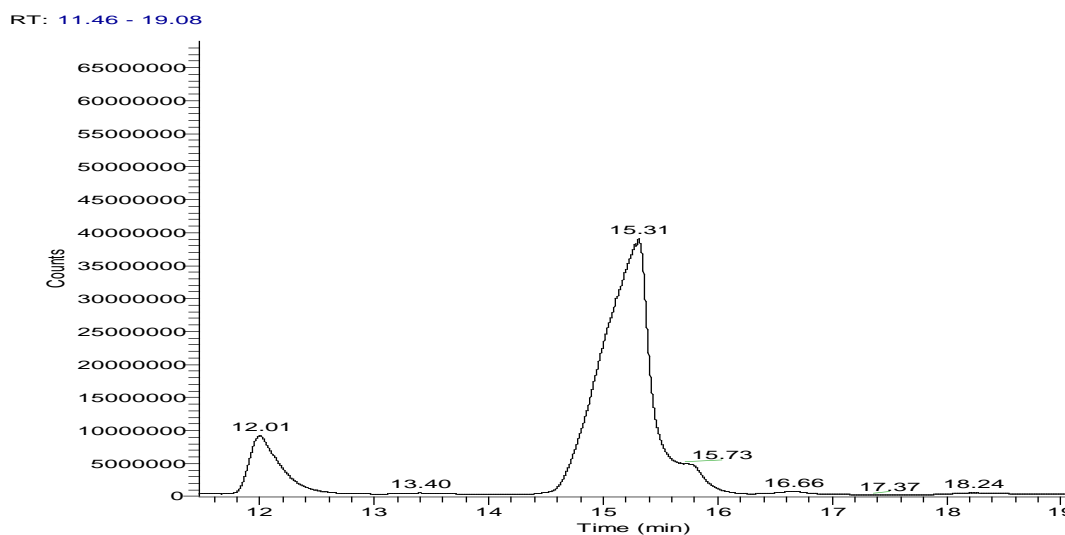


Figura 7.18 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Kombu.

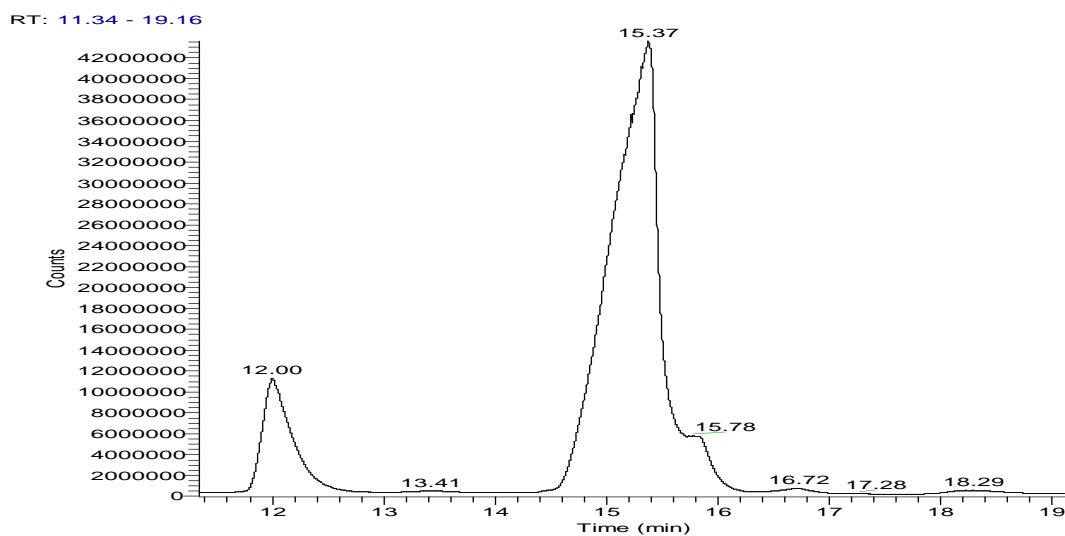


Figura 7.19 - Exemplo de Cromatograma para o azeite Nori.

Anexo VI – Perfil Sensorial – Azeite aromatizado com adição de algas

Tabela 7.4 – Perfil Sensorial elaborado para os azeites em estudo.

Descritor	Definição	Escala	Referência
Antes da degustação - Aroma			
Frutado	Aroma a fruto fresco	1-5-10	Ligeiro – Médio - Intenso
Durante a degustação - Sabor			
Frutado	Sabor a fruto fresco	1-5-10	Ligeiro – Médio - Intenso
Amargo	“ Gosto elementar sentido pelas papilas caliciformes que constituem o V língual”	1-5-10	Água – Café - Cacau
Picante	“Sensação táctil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta”	1-5-10	Pimenta – Piri-Piri - Malagueta
Doce	Sabor agradável do azeite sem ser propriamente açucarado, no qual não predominam os atributos amargo, adstringente e picante.	1-5-10	Água – Sumo de Fruta Natural – Leite Condensado
Ranço	“flavour (gosto e aroma) dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso”	1-5-10	Ligeiro – Médio - Intenso
Mofa/Húmido	“flavour característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras devido ao armazenamento dos frutos durante vários dias em condições húmidas”	1-5-10	Ligeiro – Médio - Intenso
Após degustação			
Flavour Residual	Aroma e gosto apercebidas após degustação que contempla os aspetos de adstringência, picante, salgado e persistência.	1-5-10	Ligeiro – Médio - Intenso

Anexo VII – Folha de Prova de Perfil Sensorial – Azeite aromatizado enriquecido com extrato de algas

Nome: _____

Amostra: _____

Data: __/__/____

Por favor, prove as amostras que lhe são fornecidas e avalie a intensidade percebida para cada descritor abaixo indicado, efetuando no final uma apreciação global.

Para a realização da prova comece por colocar uma mão no topo do copo e outra por baixo de forma a manter a temperatura do azeite (o azeite apresenta-se a uma temperatura que ronda os 28°C) visto que a maioria dos componentes que conferem o cheiro e sabor ao azeite são voláteis e deste modo libertar-se-ão mais facilmente. De seguida deve mover ligeiramente o azeite no interior do copo, remover a mão que se encontra no topo e inspirar lentamente. De seguida engula uma pequena porção de azeite. Esta deve decorrer toda a cavidade bucal e descer até à garganta. Quando o azeite se encontrar perto da garganta deve inspirar algum ar para que tenha a perceção das sensações retro nasais.

Pode engolir as amostras e utilizar pão como veículo de prova.

Limpe a boca entre as amostras com uma fatia de maçã e em caso de necessidade, pode lavar a boca com água.

Selecione a intensidade e marque com uma cruz a magnitude que lhe parece ser a mais indicada.

Anexo VII (Cont.) – Folha de Prova de Perfil Sensorial – Azeite aromatizado enriquecido com extrato de algas

Intensidade dos Descritores (Ligeiro, Médio, Intenso)

		1	5	10
Antes da Degustação	Aroma a Frutado	_____		
	Frutado	_____		
	Amargo	_____		
Durante a Degustação	Picante	_____		
	Doce	_____		
	Ranço	_____		
	Mofo/Húmido	_____		
	Outro: _____	_____		
Após a Degustação	Flavour Residual	_____		

Apreciação Global (coloque um X na opção que preferir):

Aceitabilidade: Gosta _____ Não Gosta _____

Observações:

Após terminar a prova, acenda a luz de presença para assinalar o fim da sua prova e certifique-se de que deixa a cabine de prova limpa.

OBRIGADO!

Anexo VIII – Folha de Prova de Teste de Consumidores

De entre os três azeites apresentados, escolha o que **mais gosta** colocando uma cruz (X) em termos de aceitabilidade global e preferência na cor:

ACEITABILIDADE GLOBAL	<input type="checkbox"/>	Azeite "C"	<input type="checkbox"/>	Azeite "N"	<input type="checkbox"/>	Azeite "K"
COR	<input type="checkbox"/>	Azeite "C"	<input type="checkbox"/>	Azeite "N"	<input type="checkbox"/>	Azeite "K"