

Campus Rio de Janeiro

**Programa de Pós-graduação *Stricto sensu*
em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Rejane Baptista Teles Carpenter

**EFEITO DO SEDIMENTO E DA MICROBIOTA SOBRE A QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL
DO AZEITE DE OLIVA KORONEIKI NÃO FILTRADO
DA REGIÃO DE AIURUOCA – MG**

Rio de Janeiro
2022

Rejane Baptista Teles Carpenter

EFEITO DO SEDIMENTO E DA MICROBIOTA SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO AZEITE DE OLIVA KORONEIKI NÃO FILTRADO DA REGIÃO DE AIURUOCA–MG

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo H. Miranda Walter

Co-orientadora: Dr^a. Adélia Ferreira de Faria-
Machado

Rio de Janeiro

2022

Rejane Baptista Teles Carpenter

EFEITO DO SEDIMENTO E DA MICROBIOTA SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO AZEITE DE OLIVA KORONEIKI NÃO FILTRADO DA REGIÃO DE AIURUOCA-MG

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data da aprovação: 04 de maio de 2022.

Prof. Dr. Eduardo H. Miranda Walter (Orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria de Alimentos

Dr^a. Adélia Ferreira de Faria-Machado (Co-orientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria de Alimentos

Dr^a. Rosemar Antoniassi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroindústria de Alimentos

Prof. Dr. Erick Almeida Esmerino
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir realizar um sonho antigo, mais um ciclo em minha vida, pois sem a Tua Presença e sabedoria, não teria sido possível. Te agradeço pelas portas abertas (Atos 12:10).

Agradeço aos meus pais, Veleda Gama Baptista, por tão grande amor, por suas orações, incentivo, por me acalmar, por desde sempre estar ao meu lado em todos os momentos e sobretudo por acreditar em mim. Ao meu pai, Edgard Baptista (o meu Dgazinho), que hoje não está mais conosco, por cada marmitta noturna levada nos dias de plantão, por cada troca de mochila pela janela do ônibus, enfim, pelos seus cuidados.

Aos meus filhos, Leandro e Leticia Baptista Teles Carpenter, por me fazerem feliz, por despertarem em mim o sentimento maravilhoso da maternidade, por me ajudarem com o computador e ouvirem minhas queixas. Amo vocês mais que demais.

Ao meu esposo, Luiz Carlos Teles Carpenter, pela paciência que do seu jeitinho me deu condições físicas e morais para continuar, e por me amar acima de qualquer coisa.

Aos meus irmãos e sobrinhos, que me impulsionam a prosseguir e mostrar que sempre é possível, não é fácil, mas sempre possível, se Deus vai à nossa frente.

À minha querida amiga, “in memorian” China, que tanto me apoiou, por todas as risadas e puxões de orelha, com quem eu formava um nó de 3 cordas.

Agradeço ao meu orientador, Eduardo H. Miranda Walter, por abraçar a minha ideia e possibilitar realizar. À minha orientadora, Adélia F. Farias-Machado, que da mesma forma teve carinho e cuidado comigo. À pesquisadora Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, pelo cuidado dedicado à minha pesquisa.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Controle de Produtos do atual IVISA-RJ, que me incentivaram, em especial à Selma Francisco Luiz, por dividir comigo essa trajetória. Também à Kátia Dantas, Camila Valente, Patrícia Souza, Madalena M. S. Barroso, e à equipe da Físico-química. Agradeço à Bruna Gasparetto, pela paciência. Agradeço à Jéssica Caroline (Embrapa Agroindústria de Alimentos), minha preceptora de coração, por todas as vezes que me ajudou com a autoclave.

Agradeço à Embrapa Agroindústria de Alimentos, por abrir as portas físicas e de conhecimento para a realização das pesquisas, às equipes do Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Óleos e Gorduras e Laboratório de Análise Sensorial.

A todos, muito, muito obrigada!

Ficha catalográfica elaborada por
Anderson Morais Chalaça
CRB7 5661

C299e Carpenter, Rejane Baptista Teles.
Efeito do sedimento e da microbiota sobre a qualidade
microbiológica, físico-química e sensorial do azeite de oliva
Koroneiki não filtrado da região de Aiuruoca – MG. / Rejane
Baptista Teles Carpenter. – Rio de Janeiro, 2022.
68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2022.

Orientadora: Prof.º Dr.º Eduardo Henrique Miranda Walter.

Co-orientadora: Dra. Adélia Ferreira de Faria-Machado.

1. Azeite – Qualidade. 2. Microbiota. 3. Análise sensorial. I.
Walter, Eduardo Henrique Miranda. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 664.347.3:579

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
(Cora Coralina).*

CARPENTER, R. B. T. *EFEITO DO SEDIMENTO E DA MICROBIOTA SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO AZEITE DE OLIVA KORONEIKI NÃO FILTRADO DA REGIÃO DE AIURUOCA–MG*. 68 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2022.

RESUMO

O azeite de oliva é o sumo da oliva obtido unicamente por processo mecânico. O produto recém obtido possui aparência turva devido à presença de microgotas de água de vegetação, partículas sólidas provenientes do fruto, compostos hidro e lipossolúveis, gliceróis e fosfolipídios que formam uma micro emulsão, produzindo um microambiente que permite a sobrevivência e desenvolvimento da microbiota composta de bactérias, bolores e leveduras oriundos da oliva. Além dessa microbiota, do material do sedimento, a degradação química e física pode dar origem a defeitos que juntos com os atributos positivos levam a diversas “impressões digitais” sensoriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do sedimento e da microbiota sobre a qualidade do azeite de oliva da variedade Koroneiki produzido em Aiuruoca–MG, comparativamente ao produto filtrado. Foram realizadas análises químicas no atual Laboratório Municipal de Saúde Pública/IVISA–RJ; na Embrapa Agroindústria de Alimentos–RJ foram realizadas análises nos Laboratórios de Óleos e Gorduras, de Microbiologia e a coordenação da análise sensorial remota pelo Laboratório de Análise Sensorial, devido ao momento de pandemia de COVID-19. Do ponto de vista químico, durante o armazenamento, houve um relativo aumento nos índices de acidez e de peróxido, em ambas as amostras, não filtrado e filtrado. A microbiologia evidenciou o desenvolvimento de bactérias, bolores e leveduras somente no azeite de oliva não filtrado, sendo realizada a enumeração e verificado que após 180 dias de armazenamento houve um decréscimo significativo dessa população microbiana. No azeite não filtrado foram percebidas alterações sensoriais como, avinagrado e fermentado, consideradas como defeitos para o azeite de oliva extra virgem, consequência do contato com o sedimento. Ainda que se tenha obtido através desse estudo a constatação da existência de uma microbiota ativa presente no sedimento do azeite de oliva recém obtido não filtrado, teve-se como limitação da pesquisa o fato de não terem sido identificadas as espécies presentes neste sedimento. São propostas para um novo estudo a identificação das espécies presentes na microbiota do azeite de oliva recém extraído, avaliar bioquimicamente e a compreensão das suas propriedades, funcionalidade.

Palavras-chave: azeite de oliva não filtrado; microbiota; armazenamento.

CARPENTER, R. B. T. *EFFECT OF SLUDGE AND MICROBIOTA ON THE MICROBIOLOGICAL, PHYSICO-CHEMICAL AND SENSORY QUALITY OF UNFILTERED KORONEIKI OLIVE OIL FROM THE REGION OF AIURUOCA–MG*. 68 f. *Stricto-sensu*

research project. Master's Program in Food Science and Technology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro *Campus*, Rio de Janeiro, RJ, 2022.

ABSTRACT

Olive oil is the juice of the olive obtained solely by a mechanical process. The newly obtained product has a cloudy appearance due to the presence of microdroplets of water from vegetation, solid particles from the fruit, hydro and fat-soluble compounds, glycerols and phospholipids that form a microemulsion, producing a microenvironment that allows the survival and development of the microbiota composed of bacteria, molds and yeasts from the olive. In addition to this microbiota, from the sediment material, chemical and physical degradation can give rise to defects that, together with the positive attributes, lead to several sensory "fingerprints". The objective of this work was to evaluate the effect of sediment/sludge and microbiota on the quality of olive oil of the Koroneiki variety produced in Aiuruoca–MG, compared to the filtered product. Chemical analyzes were carried out at the current Municipal Public Health Laboratory/IVISA–RJ; at Embrapa Agroindústria de Alimentos–RJ, analyzes were carried out at the Oil and Fats, Microbiology Laboratories and the coordination of remote sensory analysis by the Sensory Analysis Laboratory, due to the moment of the COVID-19 pandemic. From the chemical point of view, during storage, there was a relative increase in acidity and peroxide indices, in both unfiltered and filtered samples. The microbiology showed the development of bacteria, molds and yeasts only in the unfiltered olive oil, and the enumeration was carried out and it was verified that after 180 days of storage there was a significant decrease in this microbial population. In the unfiltered olive oil, sensory changes such as vinegary and fermented were perceived, considered as defects for extra virgin olive oil, a consequence of contact with the sediment / lees. Although the existence of an active microbiota present in the sediment/sludge of freshly obtained unfiltered olive oil was obtained through this study, the limitation of the research was the fact that the species present in this sediment were not identified. For a new study, the identification of species present in the microbiota of freshly extracted olive oil, biochemical evaluation and understanding of their properties and functionality are proposed.

Keywords: unfiltered olive oil; microbiota; storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo convencional de obtenção do azeite de oliva virgem.....	17
Figura 2 – Imagens da extração de azeite de oliva e do azeite filtrado e não filtrado após extração.....	18
Figura 3 – Ciclo dos desafios da produção brasileira.....	19
Figura 4 – Dinâmica do processo de percepção sensorial.....	28
Figura 5 – Visualização de azeite de oliva recém produzido com microscópio ótico, num aumento de 600X. As partículas sólidas e os micro-organismos são vistos no interior das micro gotas de água de vegetação apontados pelas setas.....	31
Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura do crescimento da estirpe de levedura DAPES 1890 <i>C. parapsilosis</i> (a) e <i>C. diddensiae</i> em ágar MYGP (b).....	32
Figura 7 – Imagens dos azeites de oliva Koroneiki — Aiuruoca – MG.....	35
Figura 8 – Etapa da filtração a vácuo.....	38
Figura 9 – Membrana após filtração e após homogeneização com solução de salina 0,9% por TURRAX.....	39
Figura 10 – Preparação das amostras para envio e posterior análise sensorial domiciliar.....	42
Figura 11 – Análises realizadas no meio PCA.....	43
Figura 12 – Análises realizadas no meio DRBC.....	45
Figura 13 – Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0 suplementado com propionato de sódio e tetraciclina.....	46
Figura 14 – Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0.....	46
Figura 15 – Análises realizadas no meio MYGP pH 4,0.....	47
Figura 16 – Observação ao microscópio ótico do sedimento corado com azul de algodão.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Atributos positivos dos azeites de oliva.....	27
Quadro 2 – Defeitos sensoriais nos azeites de oliva.....	28
Quadro 3 – Resumo gráfico da análise sensorial de azeite.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de tolerância de parâmetros de qualidade do azeite de oliva e do óleo de oliva.....	21
Tabela 2 – Limites de tolerância de parâmetros para outras análises físico-químicas do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva (somente os parâmetros analisados).....	21
Tabela 3 – Principal composição em ácidos graxos azeite de oliva.....	22
Tabela 4 – Limites de tolerância das características sensoriais do grupo azeite de oliva virgem.....	29
Tabela 5 – Enumeração de micro-organismos (UFC/mL) no azeite de oliva não filtrado da variedade Koroneiki durante armazenamento na ausência de luz e à temperatura ambiente.....	44
Tabela 6 – Perfil de ácidos graxos do azeite de oliva filtrado.....	48
Tabela 7 – Índices de qualidade do azeite de oliva da variedade Koroneiki não filtrado e filtrado na ausência de luz a temperatura ambiente.....	49
Tabela 8 – Número de menções dos atributos e defeitos sinalizados pelo painel nas amostras durante o armazenamento pelos provadores.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	CULTURA DA OLIVEIRA E A OLIVA.....	14
2.2	A PRODUÇÃO DO AZEITE.....	15
2.3	O AZEITE BRASILEIRO.....	18
2.3.1	A cultura de consumo no Brasil.....	18
2.3.2	A produção nacional.....	19
2.3.3	Legislação Brasileira.....	20
2.4	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO AZEITE DE OLIVA.....	22
2.4.1	Características físico-químicas.....	22
2.4.2	Características sensoriais.....	26
2.5	MICROBIOLOGIA DO AZEITE DE OLIVA.....	30
2.5.1	Características Microbiológicas.....	30
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	COLETA E ARMAZENAMENTO DE AZEITE NÃO FILTRADO E FILTRADO.....	34
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	35
4.2.1	Acidez livre expressa em ácido oléico.....	36
4.2.2	Extinção específica em UV/VIS.....	36
4.2.3	Índice de peróxidos.....	36
4.2.4	Índice de Iodo, pelo método de Wijs.....	36
4.2.5	Índice de Refração.....	37
4.2.6	Clorofila.....	37
4.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	37
4.3.1	Enumeração de bactérias, bolores e leveduras.....	37
4.3.2	Microscopia.....	39
4.4	ANÁLISE SENSORIAL.....	39

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	SUMÁRIO	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....		43
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....		48
5.3	OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA.....		52
5.4	ANÁLISE SENSORIAL.....		53
6	CONCLUSÃO.....		55
	REFERÊNCIAS.....		56
	Anexos.....		64

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O crescimento do consumo mundial do azeite de oliva adveio da divulgação dos seus benefícios à saúde, cientificamente comprovados, provenientes da sua ingestão. Sua ação sobre as doenças crônico-degenerativas, como por exemplo a aterosclerose, seu poder antioxidante e além das características sensoriais, oriundas da sua composição química, elevam o seu valor comercial, sendo alvo de grande interesse financeiro. Muitos países buscaram pelo desenvolvimento da cultura das oliveiras e extração do azeite e de seus derivados, adaptando o cultivo da oliveira em seu solo e seu clima (FARIA-MACHADO *et al.*, 2018).

Para a obtenção de um azeite de qualidade, é importante que os aspectos higiênicos e sanitários sejam observados durante todo o processo de extração do azeite de oliva, como a lavagem adequada das olivas, limpeza correta dos moinhos, bandejas, termobatedeiras, peneiras, e tanques evitando que resíduos de oliva fermentados contaminem a extração seguinte (CAYUELA *et al.*, 2015; VICHI *et al.*, 2011).

O processo de produção de azeite de oliva tem início na escolha da variedade da oliva para o plantio, no tipo de solo, clima, grau de maturação, condições de colheita e armazenamento. Estes fatores podem influenciar a composição dos azeites, nas suas características sensoriais e na microbiota que é carregada do fruto para o produto final (CAYUELA *et al.*, 2015; LERCKER; CARAMIA, 2010; MELLO; PINHEIRO, 2012).

Na extração do azeite de oliva, que é realizada apenas mecanicamente, as etapas de trituração e malaxação, são reconhecidas por influenciar na permanência e seleção da microbiota do produto (CIAFARDINI; CIOCCIA; ZULLO, 2017; ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2013).

Os métodos mecânicos utilizados permitem a manutenção da integridade dos componentes da oliva e o carregamento de micro-organismos para o azeite (CIAFARDINI; CIOCCIA; ZULLO, 2017). O azeite recém-produzido pode ser filtrado para eliminar a opalescência produzida pelos resíduos da oliva e pelas microgotas de água de vegetação (CAYUELA *et al.*, 2015; XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010) ou ser comercializado.

No azeite não filtrado, os resíduos da oliva e as microgotas de água de vegetação permanecem em suspensão e abrigam uma quantidade considerável dos micro-organismos existentes no fruto (CIAFARDINI; ZULLO, 2018; ZANONI *et al.*, 2015). Esta microbiota é formada por bactérias, bolores e leveduras (CIAFARDINI; ZULLO, 2002a; ZANONI *et al.*, 2015). Após a extração, o azeite é armazenado em tanques feito de material inerte, quando e onde ocorre o depósito gradativo dos

resíduos da

oliva e das microgotas de água de vegetação originando o sedimento existente no azeite não filtrado (CIAFARDINI; ZULLO, 2002a; CIAFARDINI; ZULLO, 2002b; KOIDIS;

TRIANAFILLOU; BOSKOU, 2008). A microbiota presente nos azeites não filtrados originária das olivas saudáveis se modifica ao longo do armazenamento, conferindo identidade própria a cada tipo de azeite (CIAFARDINI; ZULLO, 2018; ZANONI *et al.*, 2015).

A composição química do azeite exerce influência sobre a diversidade de micro-organismos viáveis, que permanece ativa durante o período de armazenamento (CIAFARDINI; CIOCCIA; ZULLO, 2017; CIAFARDINI; ZULLO, 2018; ZULLO; CIAFARDINI, 2008). O metabolismo da microbiota implica na produção de enzimas que reagem com os constituintes do azeite, o que pode ter um efeito positivo ou negativo na qualidade do azeite (CAYUELA *et al.*, 2015; CIAFARDINI; ZULLO, 2018).

Algumas espécies de leveduras são produtoras de enzimas (ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2013) como a β -glicosidase, esterases e lipases. A β -glicosidase promove o desamargar do azeite pela hidrólise do polifenol oleuropeína (LERCKER; CARAMIA, 2010) que é um glicosídeo amargo em compostos mais simples e menos amargos como o antioxidante hidroxitiroso (CAYUELA *et al.*, 2015; CIAFARDINI; ZULLO, 2002a; ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2013), enquanto as lipases hidrolisam triacilgliceróis, aumentando o teor em ácidos graxos livres e favorecendo as reações de auto-oxidação (CIAFARDINI; ZULLO, 2018).

Perante os desafios impostos na introdução de uma cultura tão peculiar quanto a olivicultura no país, este trabalho é uma contribuição da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Instituto de Vigilância Sanitária/IVISA-RJ e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro/IFRJ na disponibilização de informações a respeito de azeite de oliva filtrado e não filtrado da variedade Koroneiki produzido em Aiuruoca, Minas Gerais. Os azeites foram analisados durante o armazenamento de 300 dias, para avaliação de alterações em parâmetros físicos e químicos de qualidade, sensorial, assim como na enumeração de bactérias, bolores e leveduras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURA DA OLIVEIRA E A OLIVA

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família botânica *Oleaceae*; árvore de porte médio, frutífera, perene e lenhosa. É a única da espécie cujo fruto pode ser utilizado para consumo em mesa¹ ou ser utilizado para extração do azeite de oliva, um líquido de coloração amarelo esverdeado, transparente e aromático e que possui grande valor nutricional (KIRITSAKIS; TURKAN; KIRITSAKIS, 2020; LERCKER; CARAMIA, 2010).

A oliva ou azeitona, pela Botânica, é classificada como uma drupa², sendo composta de pericarpo e endocarpo (caroço). O pericarpo é formado pelo epicarpo (pele fina) e o mesocarpo (polpa) (OLIVEIRA; ABRAHÃO, 2006). Do caroço se extrai de 1% a 5% de óleo de oliva (MACHADO, 2017) e consequentemente do pericarpo aproximadamente de 95% a 99% do referido azeite (NOGUEIRA, 2012). A composição centesimal, em média da oliva é de 50% de água, 2,5% de proteínas, 22% de óleo, 24% de carboidratos e 1,5% de minerais, sendo também rica no teor de polifenóis. Todavia a composição e o rendimento podem ter modificações influenciadas pela variedade, maturação, processo de extração e outras variantes do processo (KIRITSAKIS; TURKAN; KIRITSAKIS, 2020).

O azeite de oliva extra virgem representa um dos mais importantes componentes da dieta mediterrânea, em virtude da ação dos seus componentes em algumas patologias e de seu sabor agradável e distinto (LERCKER; CARAMIA, 2010).

A crescente apreciação do azeite de oliva como alimento gourmet, devido às suas características sensoriais e a seus benefícios à saúde humana (ALMEIDA *et al.*, 2015; KIRITSAKIS; TURKAN; KIRITSAKIS, 2020), provocou um incremento mundial do seu consumo (BALLUS, 2014; CARDOSO, 2006). Tais benefícios, caracterizados pela ação sobre doenças crônico-degenerativa como alterações cardiovasculares, hipertensão, osteoporose, reumatismo, câncer e diabetes (KIRITSAKIS; TURKAN; KIRITSAKIS, 2020; LERCKER; CARAMIA, 2010; XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010; ZULLO; CIAFARDINI, 2018), são provenientes da sua composição química contendo

¹ Azeitonas de mesa: Segundo o Conselho Oleícola Internacional (1980), é o fruto de determinadas oliveiras (*Olea europaea sativa* Hoffg, Link), que colhidos no estado de maturação adequado e submetido a tratamento apropriado dá origem a um produto passível de ser consumido, de boa conservação e comercializável.

² [Botânica] Fruto carnoso que contém uma única semente protegida por um caroço duro. A polpa não é dividida em gomos como a polpa da laranja. A drupa é em geral coberta por uma pele fina. Entre as drupas encontram-se a azeitona, a ameixa, a cereja e o pêssego. <https://www.dicio.com.br/drupa/>

alto teor de compostos fenólicos, antioxidantes e elevado percentual de ácido oléico (ZULLO; CIAFARDINI, 2019).

Localizados na Região Mediterrânea, detendo aproximadamente 95% da produção mundial, os três principais países produtores são Espanha, Itália e Grécia. Portugal representa pouco mais de 1% da produção mundial (CARDOSO; DIAS, 2018). Cada país tem sua produção independente e de acordo com suas características climáticas cultiva as variedades que lhe são mais adequadas.

O processo de extração, pelas características da oliva que possui água e o azeite na polpa e na semente em concentrações variáveis³, cai na exigência de um quantitativo alto de frutos para a obtenção do azeite de oliva, o que impulsiona a busca de novas áreas de plantio à medida que o consumo expande, além de elevar o seu valor de mercado. Os países tradicionalmente produtores de olivas já não possuem mais áreas disponíveis para ampliação do plantio de oliveira (CARDOSO; DIAS, 2018).

Vários países buscam adaptar o cultivo da oliveira em seus territórios, o que incita o desenvolvimento de novas variedades de olivas. Para que o desenvolvimento da olivicultura tenha êxito, há de se considerar o clima exigido para o plantio, fator determinante para que o produto (WREGGE *et al.*, 2015b) tenha qualidade para colocação competitiva no mercado (KIRITSAKIS; TURKAN; KIRITSAKIS, 2020; WREGGE *et al.*, 2015a). Além disto, a qualidade dos frutos e as condições de processamento são fundamentais na disponibilização de azeites de oliva com qualidade apropriada à demanda de mercado (LERCKER; CARAMIA, 2010).

Sendo o Brasil um país de grande extensão territorial, possui regiões com diversas condições climáticas como a região da Serra da Mantiqueira, principalmente Minas Gerais e São Paulo, e o Rio Grande do Sul que apresentam características adequadas e com aptidão ao plantio de oliveiras e a produção de azeite de oliva (CARDOSO *et al.*, 2010). Entretanto, o sucesso depende de qual variedade mais se adapte a cada região. Atualmente, os principais estados produtores de olivas são Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo (FARIA-MACHADO *et al.*, 2018).

2.2 A PRODUÇÃO DO AZEITE

O azeite de oliva virgem é obtido a partir do fruto da oliveira, *Olea europaea* L., por processos mecânicos, exclusivamente, ou seja, apenas por prensagem do fruto sem que este seja submetido a nenhum outro tratamento químico ou de refino. Isto faz com que o processo de extração seja difícil, demorado. Pelas características do fruto, é necessário um grande quantitativo de matéria-prima para a obtenção do produto

³ As concentrações na polpa variam de 50% a 60% para água e 20% a 30% para azeite; já na

2.2. A PRODUÇÃO DO AZEITE

semente, em média a água representa 30% e o azeite 20% do peso total do fruto.

final, o azeite de oliva, em média 1 litro de azeite é obtido a partir de 5 kg de olivas (CARDOSO, 2006; JORGE, 2010). Os requisitos para a olivicultura como condições ambientais (características edafológicas e climáticas), e fatores genéticos, influenciam na composição química, pois durante o amadurecimento da oliva acontecem atividades metabólicas que influenciam na estabilidade oxidativa, nas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias como também nas propriedades sensoriais (LERCKER; CARAMIA, 2010).

A qualidade da oliva é expressa no azeite obtido, e está associada a fatores ambientais, agronômicos, de cultivo e tecnológicos. Havendo algum processo de deterioração no fruto, ou irregularidade no processo de extração do azeite, podem ocorrer reações de oxidação, alterando sabor e odor, sucedendo perda na qualidade do produto final (JORGE, 2013).

O processo de obtenção de azeite (Figura 1) é constituído por operações exteriores e interiores. As operações exteriores são formadas por duas etapas: apanha das olivas e transporte para o lagar. As operações interiores são compostas pela recepção e descarga, controle e classificação, seguida de lavagem, limpeza e pesagem, e, posteriormente, separação de acordo com a variedade de oliva e/ou estado de maturação (FREITAS, 2013). Em seguida, os frutos passam pelo moinho/moenda tradicional ou contínuo, onde tem início a separação do azeite da massa da oliva. Para aumentar o rendimento da extração, a massa é colocada em uma termobatedeira, onde ocorre a malaxação (“amassamento da pasta da oliva”) sob agitação lenta, em temperatura constante e controlada abaixo de 28 °C.

Na malaxação, ocorre a ruptura das células da polpa da oliva com liberação das gotículas de azeite que se unem umas às outras formando gotas maiores facilitando o processo da extração (XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010). O controle do tempo e da temperatura é importante para retardar a perda dos compostos voláteis, assim como manter as propriedades químicas do produto.

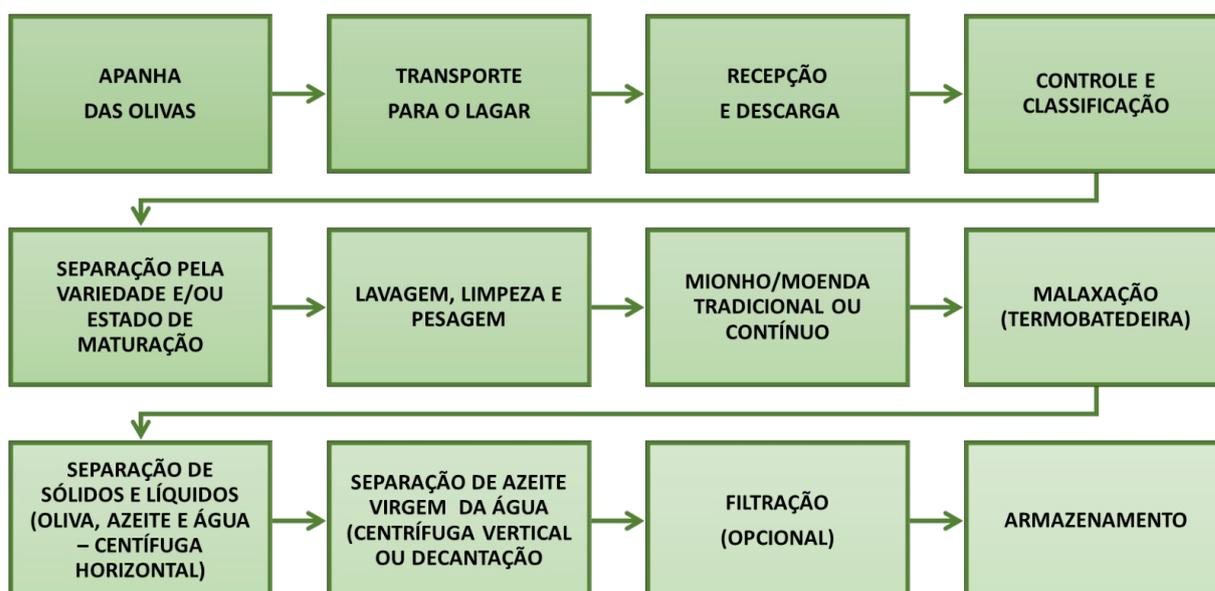
Os métodos de extração foram sendo aperfeiçoados buscando um melhor rendimento. A forma mais tradicional de extração é através da prensagem, que geralmente utiliza moinhos de pedra (XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010), porém a produção é de baixa qualidade. Percolação é outro processo que comumente emprega moinho de martelo, apresentando um rendimento baixo, cerca de 80% (FERNANDES, 2016). O método de centrifugação atende à demanda do mercado no que diz respeito a qualidade e rendimento.

Dois sistemas de centrifugação são utilizados, o de três e o de duas fases. No sistema de três fases, um percentual de água, entre 50% e 100% é adicionado⁴

⁴ Parte dos polifenóis que são polares se perdem nesta etapa, refletindo na redução da picância e

(XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010) à pasta para diminuir sua viscosidade. A pasta então passa por uma centrífuga horizontal ou de decantação, havendo a separação do bagaço que é a parte sólida do líquido formado pelo azeite e a água. A fração líquida é submetida a uma nova centrifugação vertical havendo a separação do azeite da água adicionada. Este sistema produz um grande volume de resíduos que necessitam de tratamento para o correto descarte, o que se torna em desvantagem para o método (FERNANDES, 2016).

Figura 1 – Processo convencional de obtenção do azeite de oliva virgem.



O sistema de duas fases não inclui a adição de água à pasta batida. Durante a malaxação, para que a quebra da emulsão formada seja facilitada, pode-se utilizar um material inerte como o talco (ANDRADE *et al.*, 2018; PERES; MARTINS; DIAS, 2012). Logo após esta etapa, a pasta de oliva passa por uma centrífuga horizontal ou de decantação, onde ocorre a separação da parte sólida, o bagaço e o talco, da parte líquida; esta fração líquida é submetida a uma centrífuga vertical com o objetivo de eliminar a água de vegetação presente na oliva e carregada para o azeite. Neste sistema, a quantidade de resíduo gerado é inferior àquele proveniente do sistema de três fases (DI GIOVACCHINO, 2000; FERNANDES, 2016; XENAKIS; PAPADIMITRIOU; SOTIROUDIS, 2010).

O azeite é armazenado em reservatórios de aço inox, promovendo barreira física à ação da luz e é protegido da ação de temperaturas elevadas, o que garante adequada conservação até a distribuição ou ser embalado. Durante o armazenamento, a uma temperatura entre 15 °C e 16 °C ocorre sedimentação das partículas suspensas

amargor do azeite.

(ZULLO; CIAFARDINI, 2018) e a maturação do azeite, onde se obtém o azeite não filtrado. O processo de filtração é facultativo, pode ocorrer logo após a extração, ou antes de ser embalado (Figura 2).

Figura 2 – Imagens da extração de azeite de oliva e do azeite filtrado e não filtrado após extração.



Fonte: EMPÓRIO DO AZEITE (2021) - <https://www.emporiodoazeite.com.br>

Os fatores pós-envase, incluindo as condições de transporte, temperatura de armazenamento e tipo de embalagem também devem ser monitorados. O acondicionamento em recipientes com barreira ao oxigênio e, principalmente, a luz diminui a oxidação do azeite e a perda da qualidade, prolongando a vida útil do mesmo (GARGOURI; ZRIBI; BOUAZIZ, 2015).

2.3 O AZEITE BRASILEIRO

2.3.1 A cultura de consumo no Brasil

O azeite de oliva, pelos reconhecidos benefícios a saúde, teve um aumento significativo do consumo até mesmo por países fora da Europa (FAO, 2015). O Brasil apresenta uma demanda significativa pelo consumo da oliva, seus derivados (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e em destaque o azeite de oliva, levando a um aumento da importação, tornando-se na escala mundial o oitavo maior importador e quando se faz referência aos países que não participam da União Europeia, o Brasil assume a segunda posição (SÁ; CAMPOS; FARIA-MACHADO, 2019).

2.3.2 A produção nacional

O Rio Grande do Sul foi o primeiro estado a iniciar o plantio de oliveiras em 1900 nas regiões de Caxias do Sul, Rio Grande e Bagé. Em seguida, foi o estado de Minas Gerais na cidade de Maria da Fé em 1950 (CARDOSO, 2006).

No Brasil, vários fatores como exploração econômica, disponibilidade de terras, novas opções para o produtor rural e o mercado interno crescente tem sido motivação para o investimento em pesquisa e melhoramento do cultivo das oliveiras no país (CARDOSO *et al.*, 2010).

Figura 3 – Ciclo dos desafios da produção brasileira.



Embora em desenvolvimento, o que é observado em alguns estados como Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais, a olivicultura exige condições diferenciadas do clima tropical abundante no Brasil (WREGGE *et al.*, 2015a). Como consequência, somente em alguns microclimas é possível o seu desenvolvimento (FARIA-MACHADO *et al.*, 2018).

Outros desafios são de extrema importância para a consolidação da olivicultura (Figura 3) e abrangem toda a cadeia produtiva: no que diz respeito ao cultivo (condições subtropicais, etapas da cadeia produtiva), processos tecnológicos e legislação (elaboração de normas para o uso de pesticidas, registro de variedades de oliveiras e normas para comercialização) (BERTONCINI; TERAMOTO; PRELA-PANTANO, 2010).

2.3.3 Legislação Brasileira

Na Instrução Normativa n° 1, de 30 de janeiro de 2012, alterada pela IN n° 24, de 18 de junho de 2018, do Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA (BRASIL, 2012; BRASIL, 2018), ficam estabelecidos os parâmetros de qualidade e identidade do azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva no Brasil. Nessas Instruções Normativas (Tabela 1 e Tabela 2), são definidos os limites de tolerância de parâmetros de qualidade, parâmetros de análises complementares e parâmetros de outras análises físico-químicas de azeites de oliva e do óleo de bagaço de oliva (BRASIL, 2012; BRASIL, 2018). Em outra legislação, na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 12 de 2001 da ANVISA, que dispõe sobre Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos, preconiza que o único grupo de micro-organismo estabelecido no Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de azeite é o dos Coliformes a 45 °C/g. Este grupo é indicador das condições higiênicas sanitários. Entretanto essa legislação foi substituída pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 331, de 23 de dezembro de 2019 (Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação) e Instrução Normativa (IN) n° 60, de 23 de dezembro de 2019 (Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos), onde não é mais contemplado o azeite de oliva.

Tabela 1 – Limites de tolerância de parâmetros de qualidade do azeite de oliva e do óleo de oliva.

Grupo		Azeite de oliva virgem			Azeite de oliva	Azeite de oliva refinado	Óleo de bagaço de oliva	Óleo de bagaço de oliva refinado
Tipo		Extra virgem	Virgem	Lampante	Único	Único	Único	Único
Acidez livre (%)		≤ 0,80	≤ 2,00	≥ 2,00	≤ 1,00	≤ 0,30	≤ 1,00	≤ 0,30
Índice de peróxidos (mEq/Kg)		≤ 20,0	≤ 20,0	(*)	≤ 15,00	≤ 5,00	≤ 15,00	≤ 20,00
Extinção específica no ultravioleta	270 nm	≤ 0,22	≤ 0,25	(*)	≤ 0,90	≤ 1,10	≤ 1,70	≤ 2,00
	ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	(*)	≤ 0,15	≤ 0,16	≤ 0,18	≤ 0,25
	232 nm	≤ 2,50	≤ 2,60	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)

(*) Não se aplica.

Fonte: Adaptada de BRASIL (2012).

Tabela 2 – Limites de tolerância de parâmetros para outras análises físico-químicas do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva (somente os parâmetros analisados).

Grupo		Azeite de oliva virgem			Azeite de oliva	Azeite de oliva refinado	Óleo de bagaço de oliva	Óleo de bagaço de oliva refinado
Tipo		Extra virgem	Virgem	Lampante	Único	Único	Único	Único
Índice de Refração Raia D 20 °C		1,4677	1,4677	1,4677	1,4677	1,4677	1,4680	1,4680
	a	a	a	a	a	a	a	a
		1,4705	1,4705	1,4705	1,4705	1,4705	1,4707	1,4707
Índice de iodo (Wijs)		75 a 94	75 a 94	75 a 94	75 a 94	75 a 94	75 a 92	75 a 92
Umidade e material volátil (%)		≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,10

Fonte: Adaptada de BRASIL (2012).

2.4 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO AZEITE DE OLIVA

2.4.1 Características físico-químicas

O azeite de oliva é um alimento complexo tanto do ponto de vista da análise sensorial quanto química. Possui características peculiares e uma composição que o diferencia dos demais óleos e gorduras vegetais comestíveis. A composição dos ácidos graxos presentes é considerada como sua impressão digital uma vez que expressa o quantitativo dos diferentes ácidos graxos presentes nos azeites de oliva (LERCKER; CARAMIA, 2010). A principal característica é o alto percentual dos ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, ao lado de compostos fenólicos, como oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol (ALMEIDA *et al.*, 2015; CARDOSO, 2006; MELLO; PINHEIRO, 2012), que conferem propriedades nutricionais e benefícios à saúde humana.

A principal característica do azeite de oliva, segundo a Instrução Normativa nº 01/2012 do MAPA, é a sua composição em ácidos graxos (Tabela 3), que varia de acordo com a espécie de oliva, sendo considerado o padrão de identidade e qualidade do azeite de oliva, como está descrito no Codex Alimentarius (1993) e nas normas da União Europeia (1995). O principal ácido graxo presente no azeite de oliva é o ácido oléico.

Um azeite de oliva que apresente sua composição de ácidos graxos fora dos limites estabelecidos, caracteriza uma fraude ou mistura com outra variedade de óleo.

Tabela 3 – Principal composição em ácidos graxos azeite de oliva.

Ácido graxo	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoléico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido linoléico (C18:2)	Ácido linolênico (C18:3)
Limites (%)	7,5 a 20,0	0,3 a 3,5	0,5 a 5,0	55,0 a 83,0	3,5 a 21,0	≤ 1,0

Fonte: BRASIL (2012).

A coloração dos azeites pode variar de acordo com a presença de clorofila que confere aos azeites a coloração verde, e depende da variedade e da época de colheita; já as feotinas e carotenoides fornecem coloração verde amarelada ou amarelada (BERTONCINI; TESTA, 2014; VICHI *et al.*, 2011). A coloração apresentada pelo azeite de oliva está relacionada com ponto de maturação da oliva e condições empregadas no processo de extração e atividade enzimática. A descoloração do azeite pode acontecer devido ao manejo, duração da estocagem e exposição a luz (GIULIANI; CERRETANI; CICHELLI, 2011).

O azeite de oliva é considerado um habitat complexo e muito seletivo uma vez

que sua composição química varia de acordo com a região geográfica de sua origem, se é monovarietal ou composto de outras variedades. Embora contenha essencialmente ácidos graxos, a concentração dos compostos secundários varia sendo capaz de influenciar a sobrevivência de algumas espécies leveduras que permanecem viáveis durante o armazenamento (CIAFARDINI; ZULLO, 2015; SERVILI *et al.*, 2014).

Os parâmetros físico-químicos que são preconizados como indicadores de qualidade e identidade, assim como de pureza dos azeites de oliva constam nos anexos I, III e IV da IN n° 1 de 2012 e IN n° 24 de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA. Cinco desses parâmetros são citados abaixo.

A acidez do azeite de oliva é o teor de ácidos graxos livres, expresso como porcentagem, em peso, de ácido oleico em relação à massa do produto (BRASIL, 2012). É um parâmetro importante para a classificação do azeite, entretanto somente o teor de acidez não é suficiente para avaliar sua qualidade, atributos, defeitos, estado de conservação (MELLO; PINHEIRO, 2012).

Diversas etapas do processo podem influenciar a acidez quer por maturação do fruto, pragas, ação mecânica da centrifugação e malaxagem ou refinamento (no caso das categorias que admitem mistura com azeite de oliva refinado). Quando ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis pelo contato do azeite com enzimas celulares (LERCKER; CARAMIA, 2010), leva a produção de ácidos graxos livres, alterando a concentração de íons hidrogênio, gerando aumento da acidez do azeite. A acidez é proporcional a decomposição lipídica, assim a natureza e a qualidade da matéria prima, a oliva, influenciam na acidez do azeite, porém essa análise isolada não tem suficiência para atestar sua qualidade (MELLO; PINHEIRO, 2012).

A análise de índice de peróxidos avalia o início da oxidação lipídica, sendo possível detectar os primeiros produtos da oxidação lipídica, os hidroperóxidos e peróxidos. A oxidação lipídica é um processo auto catalítico com uma velocidade sempre crescente, uma vez que é iniciado, e conforme o processo oxidativo avança, os hidroperóxidos e peróxidos que são formados, sofrem degradação dando origem a outros compostos, os produtos secundários da oxidação lipídica. Esses produtos secundários da oxidação lipídica do azeite de oliva, como aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres são voláteis e responsáveis pelos odores da rancificação. O contato do oxigênio atmosférico e sua dissolução no azeite, a temperatura, enzimas, luz e íons metálicos são indutores, influenciando a formação de radicais livres, que dão início a uma reação contínua de oxidação dos ácidos graxos, e a deterioração dos antioxidantes naturais (MELLO; PINHEIRO, 2012).

Se o valor do índice de peróxido for alto, denota que o azeite evoluirá rapidamente para continuar o processo de oxidação lipídica do azeite. Se os valores são

baixos, pode significar que o azeite está estável ou que já está completamente oxidado. O índice de peróxido é expresso em miliequivalentes-grama de oxigênio ativo por quilograma da amostra, mEq O₂/Kg (BRASIL, 2012).

O teor de antioxidantes presentes, assim como o grau de insaturação dos ácidos graxos que compõem o óleo, implica na taxa de deterioração por oxidação lipídica.

A estabilidade oxidativa de um óleo, no caso o azeite de oliva é a sua resistência a alterações químicas. A perda desta estabilidade pode advir de processos bioquímicos (depende da umidade, atividade enzimática e presença de microorganismos), ou por processos químicos (auto-oxidação ou foto-oxidação pela presença de oxigênio). A presença de insaturações, aumento de temperatura, presença de luz, agentes pro-oxidantes, dentre outros são fatores que catalisam a oxidação dos óleos/azeites. Todo o processo de oxidação finaliza com o aparecimento dos produtos secundários da reação obtidos pela cisão das moléculas, rearranjo dos peróxidos, formação de compostos voláteis e não voláteis, aldeídos e cetonas, responsáveis pelo defeito sensorial de ranço (sabor e odor desagradável).

Cabe ressaltar a importância dos compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes. Os principais antioxidantes presentes no azeite de oliva extra virgem são representados por fenóis hidrofílicos e lipofílicos e carotenoides em menor quantidade. Os fenólicos de natureza hidrofílica influenciam na vida útil do azeite assim como nas propriedades sensoriais e nas que afetam a saúde do homem (CAYUELA *et al.*, 2015; SERVILI *et al.*, 2014). A presença de microgotas de água de vegetação, o pequenino grau de umidade (mesmo sendo quase nulo) é importante considerando a polaridade dos fenólicos (CAYUELA-SÁNCHEZ; CABALLERO-GUERRERO, 2019); os coloides formados também são retidos no processo de filtração (GUERRINI *et al.*, 2015), assim, a diminuição da concentração de fenólicos favorece a fase de iniciação da auto-oxidação (GENOVESE *et al.*, 2015).

Outro parâmetro que expressa informações sobre a qualidade do óleo, identidade, o estado de conservação, boas práticas de produção e armazenamento e modificações decorrentes de processos tecnológicos é o coeficiente de extinção específica a 232 nm e 270 nm, medido através da análise espectrofotométrica na região do ultravioleta (BRASIL, 2012; HOUSHIA *et al.*, 2014); Regulamento (CEE) n° 2568/91 da Comissão, de 11 de julho - Anexo IX). Em geral, o grau de oxidação de óleos é medido através da absorção em 232 nm e 270 nm que identifica a presença de compostos decorrentes da degradação oxidativa.

Alguns produtos da oxidação provocam aumento da absorção 232 nm e outros a 270 nm, influenciando a curva de absorção no UV, curva ΔK . A curva ΔK estabelece a pureza e o grau de degradação do azeite, relaciona o estado de oxidação e também

possíveis adulterações com óleos refinados. Outros cromóforos, formados a partir da oxidação do azeite, absorvem na região entre 260 e 280 nm, e podem, apesar de terem uma extinção específica moderada, contribuir consideravelmente na intensidade de absorção nesta região; assim, a determinação do ΔK , desconta a influência desses cromóforos (MODOLO, 2007).

Em 232 nm, a extinção específica é relacionada à oxidação primária devido à conjugação de ácidos graxos polinsaturados. No comprimento de onda 270 nm, é medida a presença das cetonas insaturadas, provenientes de processo oxidativo, fase secundária de oxidação.

O uso de processos tecnológicos não permitidos, a mistura com outros óleos vegetais, com azeites de baixa qualidade ou refinados (FERNANDES, 2016) e o estado de oxidação (CASAL *et al.*, 2010; HOUSHIA *et al.*, 2014; MELLO; PINHEIRO, 2012; SANTOS *et al.*, 2013) são alterações que podem ser identificadas através da análise do valor de extinção no UV, entretanto não identifica o agente adulterante (MODOLO, 2007).

Os resultados são expressos em termos de extinção específica, $E_{1\%1cm}$, designados por K_{232} , K_{270} e variação específica, ΔK . Quanto mais baixo esses coeficientes, melhor a qualidade do azeite.

Através do índice de iodo, é avaliado o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes nos azeites e identificação de adulterações mais grosseiras como a mistura com diferentes óleos vegetais (MELLO; PINHEIRO, 2012). O índice de iodo é um intervalo característico de cada variedade de óleo, o que permite que sejam identificadas adulterações produzidas pela mistura com outros óleos vegetais, sendo a medida do grau de insaturação dos ácidos graxos que estão presentes na amostra. O seu valor é expresso como a massa de iodo absorvido por 100 (cem) gramas da amostra (BRASIL, 2012). O aumento desse índice, apresentando valores fora dos limites que identificam o azeite de oliva, sugerem a presença de outros óleos insaturados (LEONARDI; AZEVEDO; ROMANO, 2018; MELLO, 2010). A adição do iodo a dupla ligação deve ocorrer na ausência de luz e da elevação da temperatura, impedindo que haja uma reação de substituição alílica conduzindo a resultado errôneo (AFONSO *et al.*, 2004).

O índice de refração por definição corresponde a relação da velocidade da luz no vácuo com a velocidade da luz incidente na amostra, no caso o azeite (BRASIL, 2012). É característico para cada tipo de óleo e está relacionado com o grau de insaturação das ligações, com o tamanho da cadeia de ácidos graxos e o grau de pureza de um composto. Fatores como o teor de ácidos graxos livres, compostos de oxidação, tratamento térmico e variação da temperatura, influenciam nos valores desse índice. O aumento da temperatura, em geral, reduz o índice de refração. Um resultado elevado

indica a presença de um alto grau de insaturação, ou seja, a presença de um grande número de duplas ligações, sendo possível também sinalizar a possível presença de impurezas. Inversamente, o aumento do grau de saturação, implica na diminuição do índice de refração (MARQUES, 2015; MELLO; PINHEIRO, 2012).

Seus valores expressam a relação entre a velocidade que a luz percorre no vácuo com a velocidade da luz que incide sobre a amostra, no caso o azeite (BRASIL, 2012).

Outros parâmetros podem ser utilizados para verificação da identidade e qualidade do azeite de oliva, de acordo com a Instrução Normativa n^o 1 de 2012 do MAPA e sua alteração com a IN n^o 24 de 2018, que não foram abordados neste trabalho.

2.4.2 Características sensoriais

O sabor do azeite é percebido através dos receptores sensoriais humanos por meio dos compostos voláteis e outros não voláteis que estimulam o sistema gustativo, como os compostos fenólicos presentes no azeite (LERCKER; CARAMIA, 2010). Estas substâncias são classificadas como aldeídos, cetonas, polifenóis, clorofilas, álcoois alifáticos, derivados terpênicos e feotinas, possuindo relação direta com a expressão tanto dos atributos positivos como dos defeitos (CAYUELA *et al.*, 2015) principalmente no azeite de oliva extra virgem. Os defeitos podem ter origem na degradação física, química, microbiana ou no que afetar a oliva. A junção dos atributos é denominada “impressões digitais” (CAYUELA *et al.*, 2015).

Devido as suas características peculiares, a avaliação sensorial do azeite de oliva é uma ferramenta de extrema importância na definição da sua classificação mediante o estabelecido pelo Conselho Oleícola Internacional. São avaliados por meio dos sentidos humanos: odor, aroma/sabor e tátil. Os aromas e sabores complexos que resultam da combinação dos compostos presentes no azeite de oliva (BERTONCINI; TESTA, 2014; CARPENTER; LYON; HASDELL, 2002), exibem um “*flavor*” característico a cada tipo de azeite de acordo com sua composição química.

Em alguns países, a avaliação sensorial é obrigatória, além das análises químicas já mencionadas. Nesta avaliação, um grupo composto de 8 a 12 pessoas treinadas e reconhecidas por órgãos reguladores formam o que é chamado de “Painel”, liderado por um líder/coordenador que recolhe as notas conferidas aos atributos positivos ou defeitos de acordo com a qualidade do azeite (ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2013).

No Brasil, os critérios adotados pelo MAPA são os mesmos exigidos pelo COI

para a avaliação sensorial, porém a não existência de um laboratório reconhecido e credenciado não possibilitava a utilização desses critérios críticos e necessários para a realização dessa análise. Porém, o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária no Rio Grande do Sul (LFDA-RS) obteve de maneira inédita este reconhecimento até 30 de novembro de 2022, constatando a qualidade técnica das análises realizadas pelo corpo do Painel Análise Sensorial dos Azeites de Oliva Virgens (MAPA, 2021).

São critérios da avaliação sensorial: a percepção dos atributos do frutado e dos defeitos. O atributo frutado (aroma e o sabor) envolve um conjunto de sensações olfativas, sentidos por via direta e/ou retro nasal, essas sensações caracterizam a proveniência dos frutos verdes ou maduros, sadios e frescos (Quadro 1) (BERTONCINI; TESTA, 2014; TEIXEIRA, 2015).

Quadro 1 – Atributos positivos dos azeites de oliva.

Frutado	Conjunto das sensações olfativas dependentes da variedade de azeitona, por via direta e/ou retro nasal, características dos azeites provenientes de frutos sãos e frescos, verdes ou maduros.	Maduro - sensações de nozes, banana, frutas maduras e suaves, pouco amargo e picante.
		Verde - sensações de grama cortada, folha de tomate verde, alcachofra, amargor e picância forte.
Amargo	Gosto elementar característico dos azeites obtidos de azeitonas verdes ou em fase precoce de maturação, sentido pelas papilas caliciformes que constituem o “V” lingual.	
Picante	Sensação tátil de picadas em toda a cavidade bucal, em especial na garganta, característica dos azeites produzidos no início da campanha, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes.	

Fonte: Adaptada de COMISSÃO EUROPEIA (1991) e COMISSÃO EUROPEIA (2015).

A alteração dessas variáveis expressa as más condições de manuseio do fruto (VICHI *et al.*, 2011). Sendo reflexo do local de cultivo, ponto de maturação e qualidade do fruto no momento da colheita, condições de colheita e ainda seja pela ocorrência de pragas e doenças na oliveira (ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2010). Também influenciam o armazenamento das olivas⁵ (LERCKER; CARAMIA, 2010), o processo de produção (BERTONCINI; TESTA, 2014; KALUA *et al.*, 2007) (Quadro 2).

Todo o processo de percepção oral ocorre através da interação com os receptores do odor que se movem da boca para a cavidade da nasofaringe (Figura 4). A dinâmica do processo ocorre pelo efeito da respiração e da diluição do azeite por meio da saliva (Quadro 3), sendo que a continuidade da mudança do volume, composição e viscosidade do alimento são fatores importantes para essa dinâmica (LERCKER; CARAMIA, 2010). Motivo pelo qual o azeite é aspirado pela boca aumentando a volatilização e consequentemente há o aumento da superfície de contato na parte

⁵ O armazenamento inadequado acelera o desenvolvimento de calor nos pontos de contato entre as olivas e também o consumo de fenóis e polifenóis, pelo fato que o metabolismo de respiração das

2.4. CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO AZEITE DE

olivas continua.

retronasal, o que é de importância na avaliação feita pelos provadores do painel sensorial (GENOVESE *et al.*, 2015).

Quadro 2 – Defeitos sensoriais nos azeites de oliva.

Tulha/borras	Flavor característico de azeites obtidos de azeitonas amontoadas ou armazenadas em condições que as colocaram num estado avançado de fermentação anaeróbia ou dos azeites que permaneceram em contato, nos depósitos e reservatórios subterrâneos, com matérias decantadas que tenham também sofrido um processo de fermentação anaeróbia.
Mofa/úmido/terra	Flavor característico dos azeites obtidos de azeitonas atacadas por bolores e leveduras, devido à armazenagem dos frutos durante vários dias em condições úmidas ou dos azeites obtidos de azeitonas colhidas com terra ou lama que não foram lavadas.
Avinhado/avinagrado/ácido/azedo	Flavor característico de certos azeites que lembra vinho ou vinagre. Processo fermentativo aeróbio alcoólico das azeitonas. Processo fermentativo de pasta de azeitona em capachos não lavados. Formação ácido acético, acetato de etilo e etano
Ranço	Flavor dos azeites que sofreram um processo de oxidação intenso.
Cozido	Flavor característico dos azeites devido a aquecimento excessivo e/ou prolongado ou queimado durante a sua obtenção, principalmente durante a termomalaxagem da pasta, se esta for realizada em condições térmicas inadequadas. Processo fermentativo alcoólico láctico das azeitonas.
Metálico	Flavor que lembra os metais e é característico dos azeites que permaneceram em contato com superfícies metálicas durante a extração.

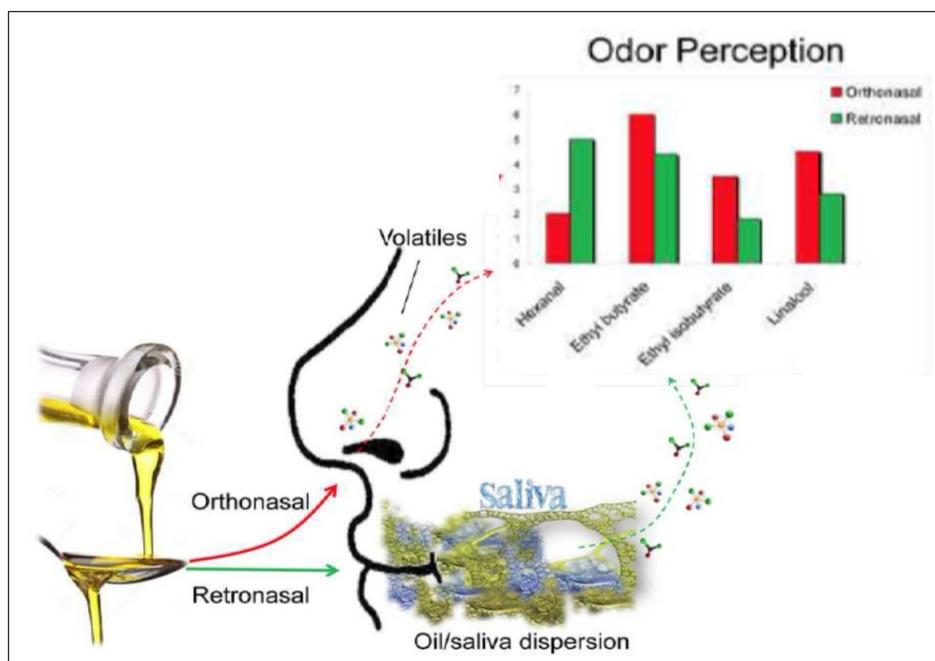
Fonte: Adaptada de COMISSÃO EUROPEIA (1991) e COMISSÃO EUROPEIA (2015).

Figura 4 – Dinâmica do processo de percepção sensorial.



Fonte: Adaptada de Genovese *et al.* (2015).

Quadro 3 – Resumo gráfico da análise sensorial de azeite.



Fonte: Genovese *et al.* (2015).

Em um painel oficial são reconhecidos, identificados e quantificados tanto os atributos positivos quanto os defeitos (Tabela 4). Os valores medianos dos defeitos, considerando o que apresenta maior intensidade, juntamente com a mediana do atributo frutado, obtidos durante a análise sensorial determinam a classificação do azeite como azeite extra virgem, virgem ou lampante, onde os valores são expressos por pontuação (BRASIL, 2012; COI, 2007).

Tabela 4 – Limites de tolerância das características sensoriais do grupo azeite de oliva virgem.

		Mediana do frutado (M.F.)	Mediana de defeitos (M.D.)	Observação
Azeite de oliva	Extra virgem	$M.F. > 0$	$M.D. = 0$	Nenhum defeito
	Virgem 5	$M.F. > 0$	$0 < M.D. \leq 3,5$	Permitida a presença de pequenos defeitos sensoriais
	Lampante	$M.F. = 0$	$M.D. > 3,5$	Tem defeitos

Fonte: Adaptada de BRASIL (2012).

Como os azeites de oliva são classificados sensorialmente pela presença ou ausência de defeitos, a análise sensorial tem importante função ao avaliar as possíveis alterações ocorridas na cadeia produtiva. As características sensoriais positivas,

agregam valor ao produto, trazendo maior rentabilidade ao olivicultor, sendo uma ferramenta utilizada pra premiação em concursos.

2.5 MICROBIOLOGIA DO AZEITE DE OLIVA

2.5.1 Características Microbiológicas

Pesquisas no âmbito microbiológico constataram uma associação entre a microbiota do azeite recém-produzido e a microbiota presente nas olivas (CIAFARDINI *et al.*, 2004), composta principalmente por leveduras, bolores e bactérias, em quantidade inferior.

A presença de leveduras nas olivas pode refletir de duas maneiras sobre o produto, seja o azeite de oliva ou azeitona de mesa:

1. produzindo deterioração do fruto (produção de odores e amolecimento do fruto);
2. produzindo atividades bioquímicas desejáveis pela ação, por exemplo, da β -glicosidase;
3. modificando as propriedades sensoriais;
4. produzindo hidrólise dos triacilgliceróis (ação das lipases);
5. produção de fatores letais para alguns micro-organismos.

Estudos recentes avaliaram o potencial probiótico (CIAFARDINI; ZULLO, 2018) das leveduras das olivas, visto que algumas espécies resistem à passagem gastrointestinal e exibem benefícios ao hospedeiro. Os benefícios em potencial a saúde incluem redução dos níveis de colesterol e inibição de patógenos (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2008; ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011; ZULLO; CIAFARDINI, 2019).

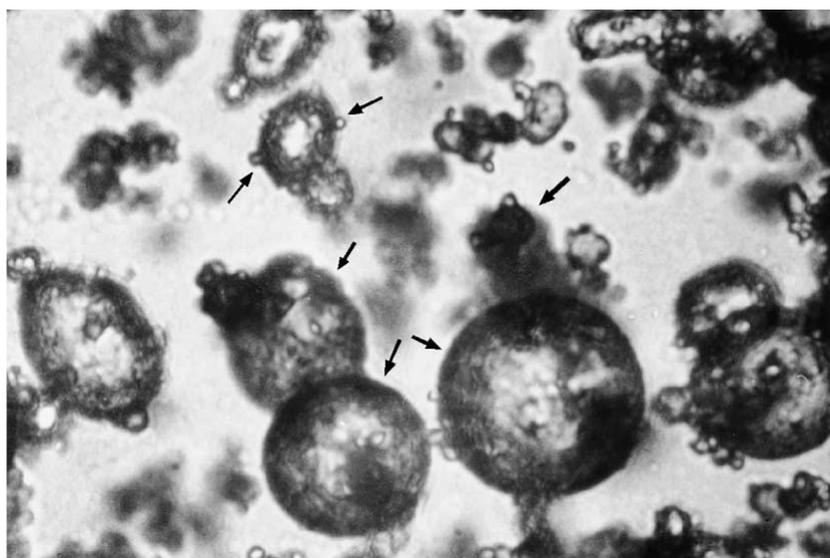
Koidis, Triantafillou e Boskou (2008) pesquisaram a microbiota e as características físico-químicas de amostras procedentes de azeite recém-extraído de uma fábrica de origem grega e também amostras do comércio local. E identificaram que a população microbiana existente, apresentava diferenças, que provavelmente tinha influência do ambiente da oliveira, da atividade antimicrobiana dos fenóis, como também da possível contaminação durante o processo de extração.

A presença de quantidade mesmo que mínima de água contribui para a formação de uma emulsão com os diacilgliceróis, monoacilgliceróis e fosfolipídios presentes no azeite, sendo denominada de micro emulsão ou suspensão (ZULLO; CIAFARDINI, 2018). Esta microemulsão juntamente com as partículas da oliva produz

um microambiente que permite a sobrevivência e desenvolvimento da microbiota do azeite. A microbiota é composta por diferentes micro-organismos, como bactérias, bolores e leveduras oriundos da própria oliva, sendo por isso considerada natural (CIAFARDINI; ZULLO, 2018; ZULLO; CIAFARDINI, 2008).

Na análise microscópica de azeite recém produzido (Figura 5) foi possível a visualização de partículas sólidas e de microgotas de água de vegetação contendo micro-organismos (CIAFARDINI; ZULLO, 2002a; CIAFARDINI; ZULLO, 2002b; LERCKER; CARAMIA, 2010). O volume físico restrito das microgotas de água de vegetação é fator limitante para a quantidade dos micro-organismos presentes (CIAFARDINI; ZULLO, 2002b; PALUMBO; HARRIS, 2011).

Figura 5 – Visualização de azeite de oliva recém produzido com microscópio ótico, num aumento de 600X. As partículas sólidas e os micro-organismos são vistos no interior das micro gotas de água de vegetação apontados pelas setas.

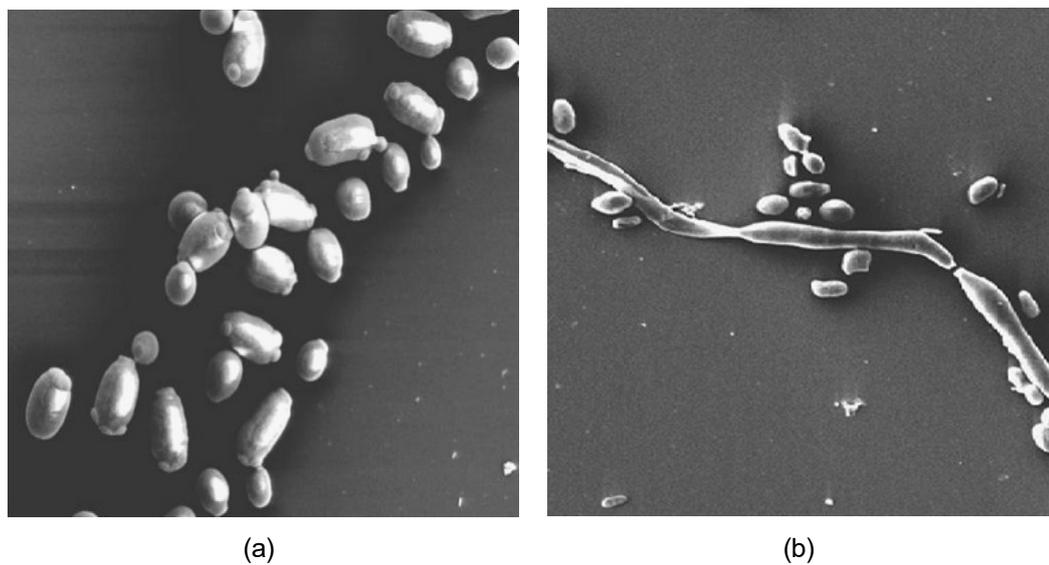


Fonte: Ciafardini e Zullo (2002a), Ciafardini e Zullo (2002b).

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a visualização de leveduras aprisionadas na superfície das partículas sólidas, que conferem juntamente com as micro gotas da água de vegetação a opalescência do azeite recém-extraído (Figura 6).

Ciafardini, Zullo e Iride (2006) verificaram a presença de leveduras em azeites comerciais se dividindo por brotamento e apresentando crescimento, o que corrobora com a probabilidade da existência de leveduras em azeite de oliva virgem. Conhecer essa microbiota é importante posto que possam vir a interferir negativamente na qualidade do azeite durante sua vida de prateleira.

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura do crescimento da estirpe de levedura DAPES 1890 *C. parapsilosis* (a) e *C. diddensiae* em ágar MYGP (b).



Fonte: Zullo, Cioccia e Ciafardini (2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do sedimento e da microbiota sobre a qualidade do azeite de oliva da variedade Koroneiki produzido na região de Aiuruoca, Minas Gerais, comparativamente ao produto filtrado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros químicos de índice de acidez, índice de peróxidos, extinção específica, índice de iodo, índice de refração do azeite de oliva filtrado e não filtrado durante a armazenagem à temperatura ambiente;
- Analisar a viabilidade de bactérias, bolores e leveduras durante o armazenamento do azeite de oliva não filtrado;
- Determinar a relação entre a microbiota e o sedimento do azeite de oliva não filtrado sobre os parâmetros de qualidade do produto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A execução deste trabalho incluiu a realização de uma visita técnica a Fazenda Experimental de Maria da Fé—MG – Unidade Regional da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG Sul de Minas) para melhor compreensão do processo de extração do azeite de oliva praticado na região.

4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DE AZEITE NÃO FILTRADO E FILTRADO

As amostras utilizadas neste trabalho foram de azeite de oliva virgem fresco (recém-extraído) da variedade Koroneiki, de um mesmo produtor, produzido no município de Aiuruoca—MG, localizado há 1.400 metros de altitude. O tempo entre a colheita e a extração é de aproximadamente 4 horas, conforme Anexo IV. O primeiro produto obtido na extração é o azeite de oliva não filtrado, após a extração ocorrendo a filtração obtém-se o azeite de oliva filtrado. Em março de 2019, foram coletadas 14 garrafas de azeite filtrado e 14 garrafas de azeite não filtrado pertencentes ao mesmo lote de partida. As amostras foram envasadas em garrafas de vidro verde escuro com tampa metálica de rosca com batoque plástico, apresentando volume útil de 260 mL e volume de azeite de 250 mL e 10 mL de espaço livre. As garrafas foram enviadas para a Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro – RJ) (Figura 7). O armazenamento foi conduzido em caixas de papelão ondulado mantida em sala com ar-condicionado, operando durante o período de trabalho diário, de segunda-feira a sexta-feira.

O mês da extração do azeite de oliva, março de 2019, foi considerado como o momento inicial e a cada dois meses foram realizadas novas análises pelo período de dez meses. Assim, nos meses maio, julho, setembro, novembro de 2019 e janeiro de 2020 novas garrafas de cada amostra foram abertas dando continuidade à pesquisa. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Controle de Produtos (LCP/IVISA-RJ), onde também foi observado em microscopia ótica o sedimento obtido após centrifugação de uma alíquota da primeira garrafa de azeite de oliva não filtrado utilizada para as análises físico-químicas. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos - RJ. A análise sensorial realizada de forma remota, pelo Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ, e foi conduzida com as amostras que foram congeladas em intervalos sucessivos de dois meses.

Figura 7 – Imagens dos azeites de oliva Koroneiki — Aiuruoca – MG.



Para realização das análises, as garrafas dos azeites foram homogeneizadas através de inversão num ângulo de 180°, 100 vezes por 3 minutos.

Os ensaios microbiológicos foram realizados em duplicata, os ensaios físico-químicos foram realizados em triplicata.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras utilizadas na pesquisa, tinham como diferencial entre elas a filtração que apesar de ser uma etapa física, influencia na composição química e estabilidade do azeite de oliva, considerando que ocorre a remoção compostos fenólicos polares que se encontram em suspensão (ZULLO; CIAFARDINI, 2018).

A composição em ácidos graxos presentes nas amostras não teria uma alteração significativa. E sob esse aspecto apenas foi realizada a composição em ácidos graxos da amostra de azeite de oliva filtrado.

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa. Os ésteres metílicos foram preparados de acordo com Antoniassi *et al.* (2018) e analisados por cromatografia em fase gasosa em equipamento Agilent 7890, equipado com detector de ionização por chama operado a 280 °C. Utilizou-se coluna capilar HP FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,30 µm) e programação de temperatura conforme descrito: temperatura inicial de 150 °C por 1 min; de 150 a 180 °C com rampa de 30 °C/min; de 180 a 200 °C com rampa de 20 °C/min; de 200 a 230 °C com rampa de 3 °C/min e na temperatura final de 230 °C por 10 min. Foi injetado 1 µL de solução a 1% em injetor aquecido a 250 °C operado no modo de divisão de fluxo de 1:50. Realizou-se a

identificação por comparação dos tempos de retenção com os padrões da NU-CHEK PREP, Inc (Elysian, MN) e SUPELCO (Bellefonte, PA) a quantificação foi realizada por normalização interna.

4.2.1 Acidez livre expressa em ácido oléico

A determinação de acidez livre foi realizada volumetricamente através de uma titulação ácido-base, com solução de hidróxido de sódio 0,01 M. A amostra foi diluída em solução éter etílico e álcool etílico na proporção, 2:1. A fenolftaleína foi usada como indicador, cuja coloração rósea devia permanecer por 30 segundos. Os resultados foram expressos em gramas de ácido oleico/100g de amostra (IAL, 2008).

4.2.2 Extinção específica em UV/VIS

A amostra foi diluída em isoctano e medida a sua absorbância no espectrofotômetro Agilent 8453 para os comprimentos de onda 270 nm e 232 nm. A leitura foi realizada com o uso de cubetas de quartzo de 1 cm de passo óptico utilizando o isoctano como branco. Para a análise do azeite além da determinação do K_{270} e K_{232} , é necessário o cálculo da variação da extinção específica (ΔK) efetuando-se leituras da solução também em 266 nm e 274 nm (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2009).

4.2.3 Índice de peróxidos

A amostra foi solubilizada em solução de ácido acético e clorofórmio, na proporção de 3:2, em seguida adicionada solução saturada de iodeto de potássio. Após 1 minuto ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, adicionou-se água destilada procedendo a titulação da amostra com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M. Assim que a solução da amostra alcançou coloração amarelo palha, adicionou-se a solução indicadora de amido 1% e continuou-se a titulação até o desaparecimento da cor azul intenso. Fez-se um branco para a reação, titulando a solução usada na diluição das amostras. Os resultados foram expressos em mEq O_2 /kg (IAL, 2008).

4.2.4 Índice de lodo, pelo método Wijs

A amostra foi solubilizada em clorofórmio, em seguida adicionou-se solução de Wijs (Solução lodo Cloro, segundo Wijs). Após 30 minutos, ao abrigo da luz em temperatura ambiente, adicionou-se solução de iodeto de potássio a 15% e água destilada. Procedeu-se a titulação da amostra com solução de tiosulfato de sódio 0,1 M.

Quando a solução da amostra adquiriu coloração amarelo palha, adicionou-se a solução indicadora de amido 1% e continuou-se a titulação até o desaparecimento da cor azul intenso. Fez-se um branco titulando o mesmo solvente utilizado na solubilização das amostras. Os resultados foram expressos em g lodo/100g (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 1995).

4.2.5 Índice de Refração

Para se iniciar a leituras no refratômetro Mettler Toledo RE 50, foi realizada a calibração do equipamento de acordo com as instruções do fabricante, utilizando água destilada e a padronização da temperatura a 20 °C, Através de leitura direta dos azeites, filtrado e não filtrado, utilizando pipetas de Pasteur descartáveis para transferências das alíquotas. Foram realizadas as leituras em triplicata, O valor obtido corresponde a relação entre a velocidade da luz através do ar e a velocidade luz através dos azeites (LUTZ, 1985).

4.2.6 Clorofila

Realizada a leitura da amostra diretamente no espectrofotômetro Agilent 8453, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de passo óptico, nos comprimentos de onda 630, 670 e 710 nm. O resultado foi expresso em teor de clorofila e pigmentos relacionados em mg/kg de óleo (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 1990).

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Enumeração de bactérias, bolores e leveduras

Alíquotas de 25 mL de cada amostra foram filtradas a vácuo através de membranas filtrantes estéreis de nitrocelulose com porosidade de 0,22 µm. A membrana filtrante, de cada amostra, foi transferida para um frasco Schott de 100 mL, contendo 80 mL de solução salina 0,9% estéril, também utilizada para as diluições, e homogeneizada a 16.000 RPM por 1 minuto em ULTRA TURRAX modelo T25 Digital (Figura 9) (CIAFARDINI; CIOCCIA; ZULLO, 2017; ZULLO; CIOCCIA; CIAFARDINI, 2010). Este foi o volume mínimo de solução salina 0,9% no frasco Schott de 100 mL, que permitiu a centrifugação a 16.000 RPM (Figura 8).

O volume de 80 mL foi transferido quantitativamente com 170 mL solução salina a 0,9% para um frasco Schott completando o volume de 250 mL, correspondendo a dilui-

ção 10^{-1} . Em seguida foram realizadas mais duas diluições decimais, correspondentes a 10^{-2} e 10^{-3} .

Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi plaqueada por superfície, em duplicata, no meio Plate Count Agar (PCA), para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, com incubação a 37 °C por 48 h.

O meio Malt Yeast Glucose Peptone (MYGP), composto de extrato de malte 3 g, extrato de carne 5 g, extrato de leveduras 3 g, dextrose 10 g, ágar-ágar 20 g, pH 7,0, de acordo com KURTZMAN e FELL (1998), que foi utilizado para enumeração de bolores e leveduras (ZULLO; CIAFARDINI, 2018). Todas as placas com as variações de MYGP foram incubadas a 25 °C pelo período de 5 dias em BOD.

O meio MYGP pH 7,0 foi acidificado com ácido láctico (10%) até pH 4,0. A acidificação torna o meio mais seletivo, inibindo o desenvolvimento de bactérias, possibilitando um melhor isolamento, detecção e enumeração de leveduras na presença de bolores, que se desenvolvem em um pH mais ácido.

Figura 8 – Etapa da filtração a vácuo.

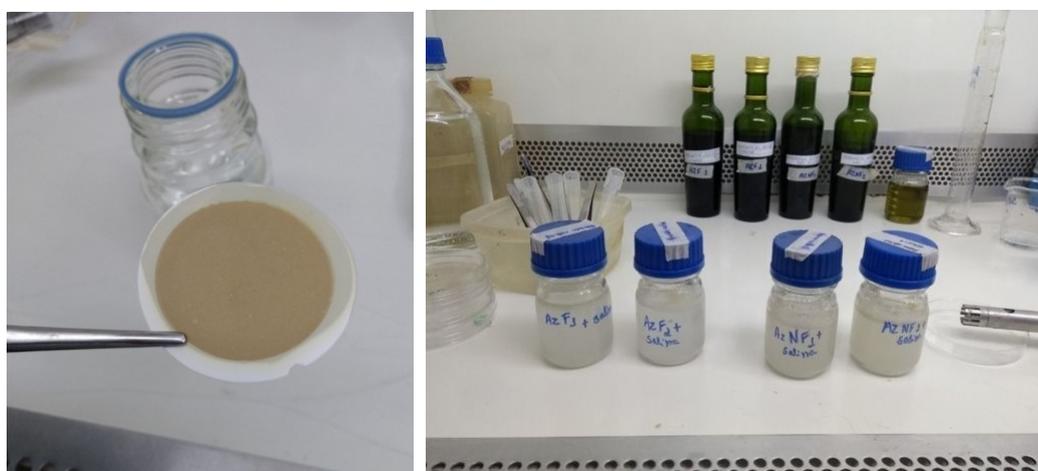


A suplementação do meio MYGP pH 7,0 com tetraciclina (20 mg/L) para inibir o desenvolvimento de bactérias e com propionato de sódio (3,0 g/L), para inibir o desenvolvimento de bolores, aumenta a contagem de leveduras (GUERRINI *et al.*, 2015; ROMO-SÁNCHEZ *et al.*, 2010; ZULLO; CIAFARDINI, 2018), tornando o meio mais seletivo.

O meio ágar dicloran rosa bengala com cloranfenicol (DRBC), composto por peptona 5,0 g, glicose 10,0 g, fosfato monopotássico 1,0 g, sulfato de magnésio

0,5 g, dicloran 0,002 g, rosa bengala 0,025 g, cloranfenicol 0,001 g, ágar 15,0 g, água destilada 1000 mL, foi utilizado por possuir em sua composição substâncias que possibilitam maior eficiência e visualização das colônias no cultivo de bolores e leveduras em alimentos, facilitando a enumeração. A presença do rosa bengala restringe a dispersão, a altura e tamanho das colônias dos fungos de desenvolvimento rápido e o desenvolvimento dos fungos mais lentos. O dicloran, antifúngico, ajuda na redução do diâmetro das colônias. A presença do antibiótico cloranfenicol inibe o desenvolvimento de bactérias. O pH ácido do meio melhora a inibição da dispersão dos fungos (BONDAM *et al.*, 2020; FAIA, 2011; SAATKAMP, 1998).

Figura 9 – Membrana após filtração e após homogeneização com solução de salina 0,9% por TURRAX.



4.3.2 Microscopia

A análise microscópica do azeite de oliva não filtrado foi realizada em duplicata, com alíquotas de 10 mL. As amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos com solução salina 0,9% em volume suficiente apenas para soltar o pellet do fundo do tubo de centrifugação. Uma gota da amostra foi levada ao microscópio ótico (modelo Olympikus 50) com um aumento de 400X, utilizando solução de azul de algodão como corante.

4.4 ANÁLISE SENSORIAL

As amostras após serem analisadas pela físico-química e pela microbiologia foram armazenadas a uma temperatura de -15 ± 5 °C, até o momento da realização do teste. A análise sensorial foi realizada em duas seções, uma com as amostras de azeite não filtrado e outra com o azeite filtrado, de forma remota.

A realização da avaliação sensorial remota foi planejada após alguns encontros virtuais, com a equipe do Laboratório de Análise Sensorial da Embrapa Agroindústria de Alimentos e os orientadores da referida pesquisa. Devido à pandemia de Covid-19, um procedimento logístico foi elaborado e aplicado com o objetivo de que as amostras chegassem na casa dos avaliadores, ainda mantendo suas características, visto que não estava ocorrendo atividades presenciais na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

As etapas de planejamento logístico foram:

1. Definição dos procedimentos e regras de ouro de prevenção à infecção do vírus Covid-19, para segurança dos analistas e participantes dos testes sensoriais;
2. Definição do local de preparo das amostras;
3. Higienização do local;
4. Higienização dos frascos;
5. Porcionamento e identificação das amostras;
6. Transporte das amostras;
7. Análise sensorial domiciliar;
8. Análise e interpretação dos resultados.

O levantamento dos descritores sensoriais utilizados na avaliação sensorial foi fundamentado na expertise do azeitológico que fez uma avaliação prévia das amostras, utilizando a ficha de avaliação (Anexo II), que consta na norma COI (Regulamento CE n° 2568/91), norteando assim a seleção dos atributos a serem considerados. Os atributos por ele assinalados, sendo pela intensidade de sua percepção dos defeitos e dos atributos positivos, ou anotações de notas sensoriais específicas, foram considerados para a avaliação sensorial pelo painel de avaliadores.

A partir da lista de descritores, a equipe de avaliadores utilizou o critério de presença ou ausência de atributos sensoriais positivos (frutado, amargo, picante) e de defeitos (avinagrado, metálico, rançoso, sedimento, fungado e outros).

Os avaliadores, que foram convidados a participar da avaliação sensorial das amostras desta pesquisa, são funcionários do quadro da Embrapa Agroindústria de Alimentos—RJ. Estes profissionais fazem parte do grupo habilitado, pela sensibilidade reconhecida no Teste para Seleção de Avaliadores de Azeite de Oliva realizado pelo Laboratório de Análise Sensorial e vir a fazer parte do futuro Painel Sensorial de Azeites da Embrapa Agroindústria de Alimentos—RJ. O grupo vem

4.4. ANÁLISE SENSORIAL

recebendo treinamento ministrado por um azeitológico, que teve início em 2018. O grupo voluntário participante é

composto de dez avaliadores, nove mulheres, e um homem, com idade variando de 30 a 60 anos. Os critérios estabelecidos foram presença e ausência e a intensidade dos atributos sensoriais (frutado, amargo e picante) e dos defeitos (avinagrado, metálico, rançoso, fungado e outros) quantificados de 1 a 5, obtendo-se uma pontuação do perfil sensorial qualitativo das amostras.

Para a realização das sessões de avaliação, foi encaminhado para as residências de cada participante uma sacola de papel, contendo 2 caixas de isopor, cada uma com 4 frascos de vidro com cerca de 15 mL de azeite de oliva, e um frasco plástico contendo 30 mL de álcool 70%. Foram realizadas duas sessões de avaliação com o painel, uma para cada grupo de amostras (filtrado e não filtrado), sendo TESTE 1 para as amostras de azeite filtrado e TESTE 2 para as amostras de azeite não filtrado, a identificação fixada na superfície da respectiva caixa (Figura 10).

As amostras estavam codificadas com números compostos por três dígitos aleatórios; a numeração é feita dessa forma buscando evitar erros pelo uso de códigos simples que viessem induzir a expectativas ou associações. As amostras foram apresentadas em ordem balanceada, por delineamento de blocos completos, aos avaliadores, conforme eram apresentados os códigos das amostras na ficha de avaliação de cada avaliador.

Foi disponibilizado junto com as amostras, as instruções para realização do teste e o vocabulário utilizado na categorização de azeite de oliva extra virgem (anexo I). A ficha de avaliação foi elaborada no software Compusense e disponibilizada através de um link para os avaliadores através do QR code fixado em cada grupo de amostras.

Os avaliadores foram instruídos a selecionar, dentre a lista de descritores, os termos que se aplicavam para caracterizar as amostras.

4.4. ANÁLISE SENSORIAL

Figura 10 – Preparação das amostras para envio e posterior análise sensorial domiciliar.



(a) PREPARAÇÃO DOS KITS



(b) KIT DOS PROVADORES



(c) AZEITE FILTRADO



(d) AZEITE NÃO FILTRADO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A caracterização microbiológica do azeite de oliva da variedade Koroneiki não filtrado, com armazenamento à temperatura ambiente na ausência de luz, é apresentado na Tabela 5.

As amostras de azeite de oliva filtrado, em todos os períodos analisados não apresentaram enumeração para os grupos de micro-organismos investigados neste estudo.

Análises realizadas no meio PCA (Figura 11). No primeiro mês, a concentração inicial de bactérias aeróbicas mesófilas no meio PCA para azeite de oliva não filtrado foi $1,2 \times 10^6$ UFC/mL. No segundo e quarto mês de análise, houve uma diminuição do número total de bactérias. A partir do sexto mês, foi observada uma redução expressiva no número total de bactérias, quando no oitavo mês, apresentou como resultado de enumeração o valor estimado de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL.

Figura 11 – Análises realizadas no meio PCA.

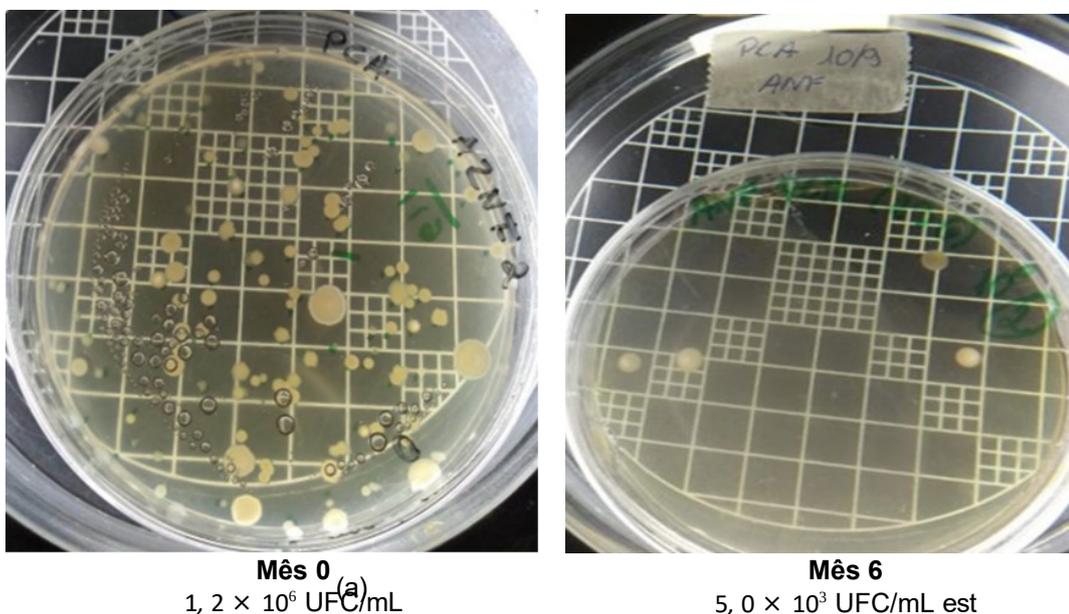


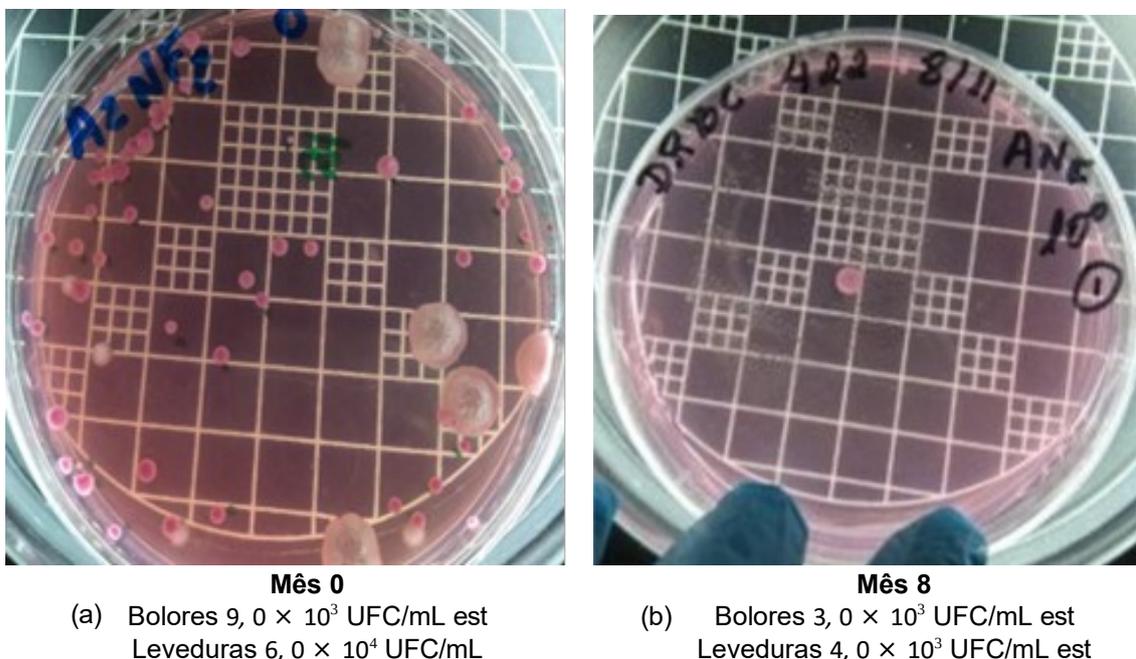
Tabela 5 – Enumeração de micro-organismos (UFC/mL) no azeite de oliva não filtrado da variedade Koroneiki durante armazenamento na ausência de luz e à temperatura ambiente.

Meio de cultura	Grupo de micro-organismos	Tempo de armazenamento (mês)				
		0	2	4	6	8
MYGP 4 Aerobiose	Bolores	$1,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$ est	$4,0 \times 10^5$ est	$3,0 \times 10^6$ est	$5,0 \times 10^7$ est
	Leveduras	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$ est	$6,0 \times 10^7$ est
MYGP 7	Bolores	$2,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$ est	$4,0 \times 10^5$ est	$2,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
	Leveduras	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$
MYGP 7 suplementado	Bolores	$5,0 \times 10^3$ est	$3,0 \times 10^5$ est	$2,0 \times 10^5$ est	$4,0 \times 10^6$ est	$<1,0 \times 10^2$ est
	Leveduras	$2,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$ est	$5,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$ est	$3,0 \times 10^7$ est
DRBC	Bolores	$9,0 \times 10^3$ est	Contaminação	$3,0 \times 10^3$ est	$2,0 \times 10^3$ est	$3,0 \times 10^3$ est
	Leveduras	$6,0 \times 10^4$	Contaminação	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$ est	$4,0 \times 10^3$ est
PCA	Bactérias	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$ est	$9,0 \times 10^3$ est

Nota: est - valor estimado

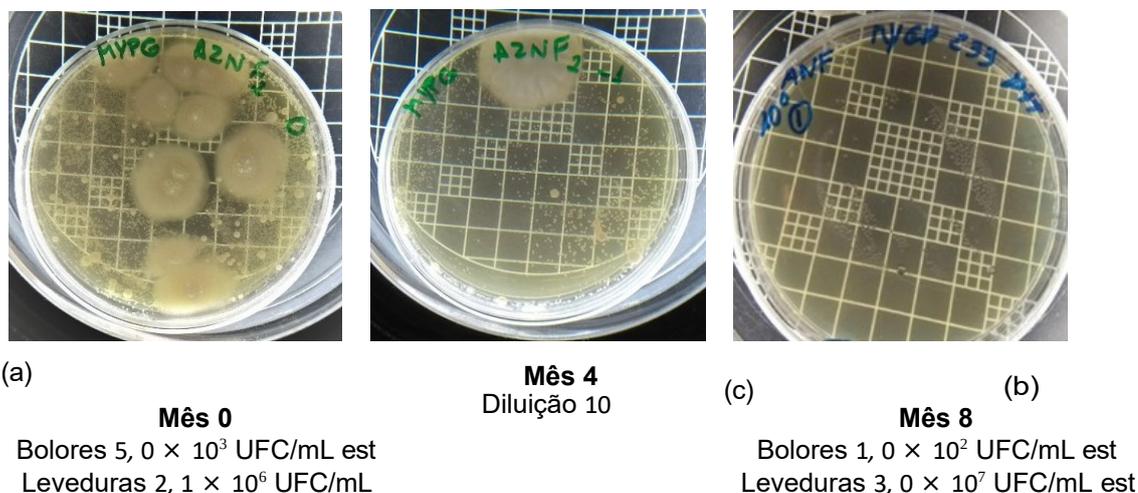
Análises realizadas no meio DRBC (Figura 12). No segundo mês, ocorreu contaminação durante o momento de semeadura. No primeiro mês, o azeite de oliva não filtrado apresentou valor estimado para bolores de $9,0 \times 10^3$ UFC/mL, para leveduras a enumeração foi de $6,0 \times 10^4$ UFC/mL. A partir do quarto mês, os bolores permanecem com enumeração abaixo do limite de detecção, apresentando no sexto mês, a enumeração de $3,0 \times 10^3$ UFC/mL estimado. As leveduras apresentam uma contagem de $6,0 \times 10^4$ UFC/mL e $5,0 \times 10^4$ UFC/mL para o primeiro e o quarto mês, respectivamente. A partir do sexto mês, foi observada uma diminuição gradual no número total de leveduras, quando no oitavo mês, apresentou como resultado de enumeração de $4,0 \times 10^3$ UFC/mL estimado.

Figura 12 – Análises realizadas no meio DRBC.



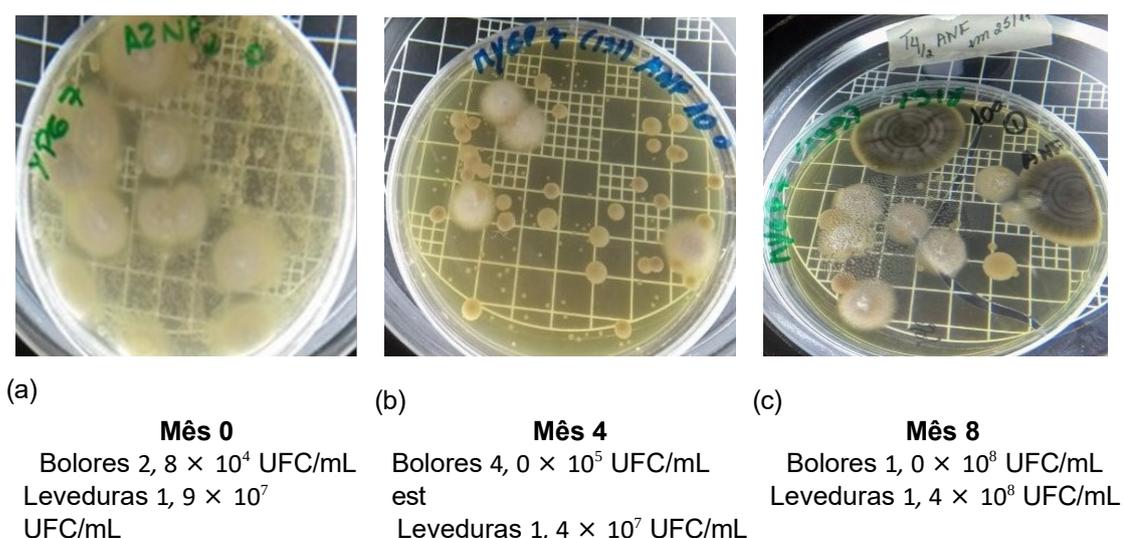
Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0 suplementado com propionato de sódio e tetraciclina (Figura 13). Em todos os tempos, a enumeração de bolores foi abaixo do limite de detecção, apresentando valores estimados. No oitavo mês, apresentou como resultado de enumeração de $< 1,0 \times 10^2$ UFC/mL estimado. No primeiro mês, as leveduras apresentaram $2,1 \times 10^6$ UFC/mL. No segundo mês, apresentou valor estimado de $4,0 \times 10^4$ UFC/mL, porém a partir do quarto mês houve decréscimo nos valores encontrados. Chegando ao oitavo mês, com $3,0 \times 10^7$ UFC/mL estimado. Sendo que no primeiro mês, a suplementação foi somente com propionato de sódio que inibe o crescimento de bolores e aumentando a contagem de leveduras. Sendo então encontrados valores estimados de bolores desde o primeiro mês de análise. A partir do segundo mês de análise, o meio foi acrescido de tetraciclina, inibidor do desenvolvimento bacteriano.

Figura 13 – Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0 suplementado com propionato de sódio e tetraciclina.



Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0 (Figura 14). No mês inicial, a enumeração para bolores foi $2,8 \times 10^4$ UFC/mL e as leveduras apresentaram $1,9 \times 10^7$ UFC/mL. Os bolores no quarto e sexto mês, tiveram decréscimo nos valores encontrados, porém no sexto e oitavo mês, respectivamente, voltaram a apresentar valores maiores. A enumeração das leveduras permanece praticamente constante durante o período de armazenamento. Nesse pH, 7,0, os bolores e leveduras continuaram a se expressar durante o armazenamento de forma mais significativa que em outros meios utilizados ou variações do meio MYGP.

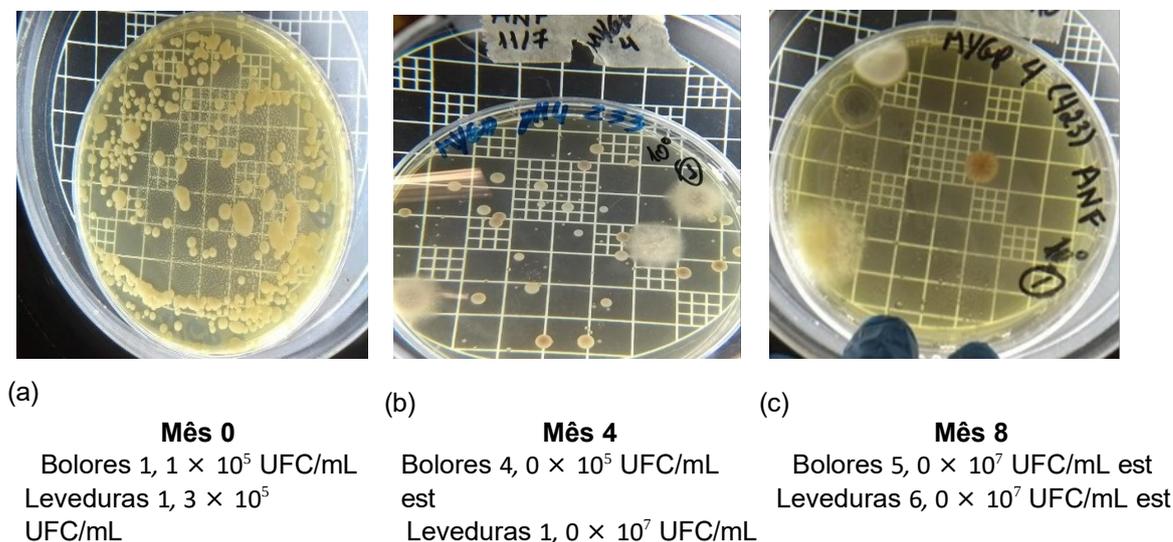
Figura 14 – Análises realizadas no meio MYGP pH 7,0.



Análises realizadas no meio MYGP pH 4,0 (Figura 15). Análise realizada no mês inicial, apresentou resultado para bolores e leveduras, de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL e $1,3 \times 10^5$ UFC/mL respectivamente. A partir do segundo mês de armazenamento, ocorre uma diminuição significativa na enumeração de bolores até o sexto mês de

armazenamento. As leveduras mantiveram a enumeração, embora decrescente, até o quarto mês. A partir do sexto mês de armazenamento, foram estimados valores decrescentes.

Figura 15 – Análises realizadas no meio MYGP pH 4,0.



A enumeração de leveduras em MYGP pH 7,0 suplementado e DRBC foi inferior a obtida em MYGP pH 7,0 em todos os tempos estudados e se intensificou durante o armazenamento. O meio MYGP pH 4,0, no segundo e no quarto mês, respectivamente, mantiveram a enumeração relativamente igual ao meio MYGP pH 7,0, porém nos meses seguintes, a enumeração apresentou valores estimados diferentemente do meio MYGP pH 7,0.

Conforme descrito por Zullo e Ciafardini (2018), foi encontrado no momento inicial da pesquisa, ou seja, logo após a extração, uma contagem de leveduras e bactérias superior à de bolores (CIAFARDINI; ZULLO, 2002a), porém, a partir do terceiro mês do início da pesquisa, a enumeração começa a decrescer para valores estimados. Considerando que o azeite de oliva não filtrado é um meio seletivo, complexo, que o sedimento é rico em água de vegetação, nutrientes provenientes do mesocarpo da oliva (CIAFARDINI; ZULLO, 2002b), e que o azeite propriamente dito possui uma composição rica em compostos como pectina, fenólicos, carotenóides, tocoferóis, antioxidantes dentre outros (CAYUELA *et al.*, 2015) e que a sobrevivência e o desenvolvimento da microbiota presente estão relacionados a presença de compostos nutritivos, uma vez que ocorre o consumo dos nutrientes, a aliada a própria seletividade devido a composição química do azeite de oliva é esperado que haja uma redução de número de microrganismos viáveis.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O perfil de ácidos graxos do azeite de oliva filtrado é apresentado na Tabela 6, e a sua composição em ácidos graxos se apresenta dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente, sinalizando a identidade de um azeite de oliva sem adulterações, com uma maior percentagem de ácido oléico, uma característica de identidade do azeite de oliva.

Tabela 6 – Perfil de ácidos graxos do azeite de oliva filtrado.

Ácido graxo	C16:0	C16:1	C17:1	C18:0	C18:1	C18:1p	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	Total
Média	10,211	0,688	0,080	2,077	77,911	2,047	4,213	0,834	0,414	0,366	0,155	1,00

Os índices de qualidade analisados (acidez, índice de peróxidos, extinção específica, índice de iodo, índice de refração e clorofila) no azeite de oliva da variedade Koroneiki não filtrado e do filtrado, com armazenamento à temperatura ambiente na ausência de luz, são apresentados na Tabela 7.

A acidez inicial do azeite filtrado foi $0,24 \pm 0,02$ g de ácido oléico/100g e do azeite não filtrado $0,29 \pm 0,02$ g de ácido oléico/100g. No sexto mês de armazenagem foi verificada uma variação na acidez maior que 0,1 g de ácido oléico/100g nos dois tipos de azeite. Nas análises realizadas no oitavo e décimo mês foi verificado um aumento na acidez com valores de $0,38 \pm 0,01$ g de ácido oléico/100g para o filtrado e principalmente no azeite de oliva não filtrado, sendo $0,46 \pm 0,03$ g de ácido oléico/100g. Os dois tipos de azeite apresentaram uma acidez menor que o padrão legal de 0,8 g de ácido oléico/100g (BRASIL, 2012).

O aumento da acidez é indicativo da hidrólise dos triacilgliceróis com liberação de ácidos graxos. E exerce influência na estabilidade do azeite. No caso do azeite não filtrado houve um maior aumento, o que sugere que as reações enzimáticas e químicas entre o material do sedimento e o azeite de oliva. A presença de leveduras produtoras de lipases pode ocasionar o aumento da hidrólise dos triacilgliceróis e a produção ácidos graxos livres (ZULLO; CIAFARDINI, 2008).

Durante o processo de filtração, o sedimento, a água de vegetação, os coloides formados (GUERRINI *et al.*, 2015), os fenóis hidrofílicos (antioxidantes polares) são retidos. A redução da umidade e da água de vegetação levam a uma diminuição da taxa de hidrólise do triacilgliceróis (FREGAPANE *et al.*, 2006). O início do processo de auto-oxidação pode ser favorecido pela diminuição da concentração de fenólicos (CAYUELA-SÁNCHEZ; CABALLERO-GUERRERO, 2019; GENOVESE *et al.*, 2015).

Tabela 7 – Índices de qualidade do azeite de oliva da variedade Koroneiki não filtrado e filtrado na ausência de luz a temperatura ambiente.

Análise	Azeite	Tempo de armazenamento (mês)					
		0	2	4	6	8	10
Acidez (g ácido oléico/100g)	Filtrado	0,24 ± 0,02	0,20 ± 0,003	0,28 ± 0,01	0,37 ± 0,008	0,35 ± 0,007	0,38 ± 0,01
	Não filtrado	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,032	0,30 ± 0,01	0,42 ± 0,008	0,46 ± 0,003	0,46 ± 0,03
Índice de peróxido (mEq O²/Kg)	Azeite filtrado	9,62 ± 0,28	8,88 ± 0,11	9,62 ± 0,10	8,01 ± 0,49	11,08 ± 0,74	12,19 ± 0,11
	Não filtrado	10,90 ± 0,74	10,86 ± 0,01	8,43 ± 0,10	9,12 ± 0,28	13,24 ± 0,27	13,24 ± 0,15
Extinção específica K₂₃₂	Filtrado	1,31	1,39	1,39	1,46	1,59	1,60
	Não filtrado	1,55	1,58	1,39	1,58	1,64	1,64
Extinção específica K₂₇₀	Filtrado	0,16	0,16	0,16	0,16	0,17	0,18
	Não filtrado	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,19
ΔK	Filtrado	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Não filtrado	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Índice de refração (D 20°C)	Filtrado	1,4688	1,4688	1,4688	1,4689	1,4688	1,4689
	Não filtrado	1,4689	1,4687	1,4688	1,4688	1,4688	1,4689
Índice de iodo (g I₂/100 g)	Filtrado	80,45 ± 0,53	82,77 ± 1,43	83,26±	83,70±0,52	82,24±0,21	81,01±0,08
	Não filtrado	80,55 ± 0,59	85,31 ± 0,21	81,22±	85,65±0,16	82,57±0,34	82,28±0,30
Clorofila e pigmentos (mg/Kg de óleo)	Filtrado	15,42 ± 0,001	16,14 ± 0,055	15,86 ± 0,026	15,78 ± 0,01	15,50 ± 0,017	Não Realizado
	Não filtrado	10,93 ± 0,005	11,22 ± 0,01	11,26 ± 0,01	11,18 ± 0,02	11,31 ± 0,01	Não Realizado

O índice de peróxido inicial do azeite filtrado foi $9,62 \pm 0,28$ mEq O₂/kg e o azeite não filtrado $10,90 \pm 0,74$ mEq O₂/kg. Os dois tipos de azeite apresentaram um pronunciado aumento no índice de peróxido no oitavo mês de armazenamento. Neste período o índice de peróxido do azeite filtrado foi $11,08 \pm 0,74$ mEq O₂/kg e do não filtrado $13,24 \pm 0,27$ mEq O₂/kg. No décimo mês de armazenamento o índice de peróxido do azeite filtrado teve um acréscimo para $12,19 \pm 0,11$ mEq O₂/kg, enquanto o azeite não filtrado manteve o mesmo valor observado no oitavo mês. Os dois tipos de azeite apresentaram uma acidez menor que o padrão legal de 20 mEq O₂/kg (BRASIL, 2012).

O processo de oxidação lipídica ocorre de forma gradual e progressiva, sendo um processo inerente aos óleos e suas causas podem ser diversas, auto-oxidação, enzimática, hidrolítica, como também resultante do metabolismo de uma microbiota existente (GUERRINI *et al.*, 2015; ZULLO; CIAFARDINI, 2018).

A concentração de peróxidos durante o armazenamento tende a aumentar pelo aumento dos produtos resultantes da fase de propagação no processo de oxidação lipídica. Assim o aumento do índice de peróxido pode ser associado ao processo de oxidação do azeite de oliva, pela formação de peróxidos, um dos primeiros compostos resultantes desse processo. Quando se avalia a evolução do processo de oxidação, durante o armazenamento, foi observado que o maior aumento ocorreu com o azeite não filtrado, presumindo que há influência da composição do sedimento e da contaminação microbiológica das azeitonas no processo de iniciação da oxidação lipídica.

A umidade, mesmo em baixas concentrações, as microgotas de água de vegetação (CAYUELA *et al.*, 2015) e os indutores no sedimento do azeite não filtrado, como enzimas, micro-organismos, insaturações e clorofila podem acelerar o processo de iniciação da oxidação. A reação, uma vez iniciada, se propaga até que os subprodutos, sejam transformados em substrato para a próxima fase da oxidação lipídica e consumidos pela mesma. Hidrocarbonetos, ácidos graxos de cadeia curta, radicais livres e compostos voláteis como aldeídos e cetonas, são produtos dessa reação produzindo o odor e sabor do ranço durante o armazenamento (CAYUELA *et al.*, 2015; VICHI *et al.*, 2011). Embora a presença de compostos antioxidantes no azeite de oliva, como os compostos fenólicos, os tocoferóis por exemplo, seja realidade, uma vez também consumidos, o processo de oxidação tende a prosseguir.

A extinção específica inicial do azeite de oliva filtrado no comprimento de onda 232 nm (K₂₃₂) foi 1,31, no comprimento de onda 270 nm (K₂₇₀) 0,16 e a variação do coeficiente de extinção (ΔK) < 0,01. No azeite não filtrado, a extinção específica inicial foi K₂₃₂ de 1,55, o K₂₇₀ 0,17 e o ΔK de < 0,01. Após oito meses, o azeite filtrado apresentou K₂₃₂ foi 1,59, K₂₇₀ 0,17 e ΔK de < 0,01; o azeite não filtrado também apresentou um aumento sendo, K₂₃₂ foi 1,64, K₂₇₀ 0,18 e ΔK < 0,01.

Essas variações, embora pequenas, demonstram a possibilidade de que produtos de oxidação primária começam a se fazer presente, porém ambas as amostras apresentam valores para 232 nm menor ou igual a 2,50. Quanto aos valores de 270 nm, onde são identificados produtos secundários de oxidação como as cetonas insaturadas, as amostras apresentam valores menor ou igual a 0,22. Conseqüentemente, ΔK para as amostras apresenta valor menor que ou igual a 0,01 indicando pureza e que estavam dentro dos limites determinantes de qualidade do azeite de oliva.

Essa distinção é interessante porque permite diferenciar os estados de evolução da oxidação das amostras, sua identidade, seu estado de conservação e possíveis mudanças ocorridas durante seu processamento.

Os valores encontrados para a análise de índice de iodo nas amostras de azeite filtrado e não filtrado no início do experimento foi respectivamente 80,45 e 80,55 e após 10 meses de armazenamento respectivamente 81,01 e 82,28. Os resultados obtidos se encontram na mesma ordem de grandeza, embora com uma pequena variação que não expressa adulteração sendo o limite para tal índice de 75 e 94, para azeite extra virgem. Esse índice detecta possíveis adulterações que revelam alterações na composição de ácidos graxos, quando é identificado o grau de insaturação. O teor de iodo é proporcional a quantidade de insaturações presentes.

O índice de refração é característico de cada tipo de óleo, assim para o azeite de oliva extra virgem varia entre 1,4677 e 1,4705. Os resultados obtidos para ambas as amostras durante o experimento se encontram dentro do limite estabelecido pela legislação, IN n° 1/2012, variando de 1,4688 a 1,4689 ao fim de 10 meses.

Ambos os índices, de refração e de iodo, se modificam em função do grau de insaturação no azeite de oliva, sendo importante no controle do processo de hidrogenação quando se deseja converter os óleos vegetais líquidos e insaturados em gorduras sólidas e estáveis a temperatura ambiente, como na produção de margarinas, gorduras e outros produtos semi-sólidos.

As análises de índice de iodo e de refração complementam a pesquisa quanto a pureza das amostras com valores dentro do limite de aceitação. Ambos apresentaram valores dentro da categoria de azeite extra virgem (Tabela 7).

Os resultados de clorofila e pigmentos relacionados apresentaram diferentes valores entre as amostras no início do experimento, para o azeite filtrado de $15,42 \pm 0,001$ mg/kg de óleo, para o não filtrado de $10,93 \pm 0,005$ mg/kg de óleo. Após oito meses de armazenamento os resultados foram $15,50 \pm 0,017$ mg/kg de óleo para o azeite filtrado e $11,31 \pm 0,01$ mg/kg de óleo para o não filtrado. A dosagem do teor de clorofila após 10 meses de armazenamento não pode ser realizada devido ao momento de pandemia Covid-19. Os dados obtidos no período

analisado têm uma variação

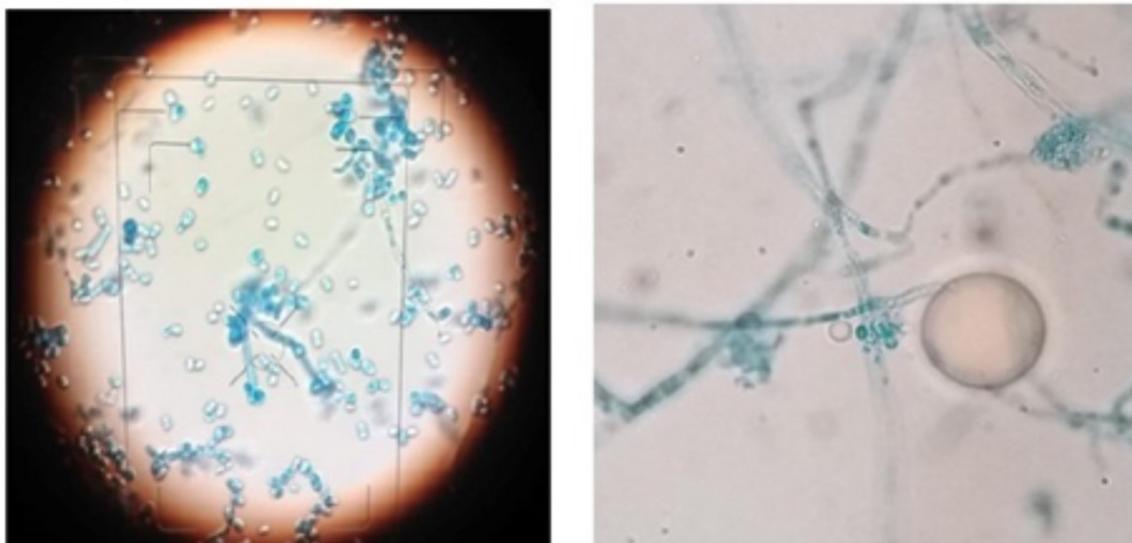
pouco expressiva durante o armazenamento (Tabela 7). A presença desses compostos, além de trazer cor ao azeite de oliva (varia do verde amarelado ao amarelo esverdeado) tem atividade antioxidante, quando na ausência de luz) e pró-oxidante quando na presença de luz, podendo ocasionar degradação do azeite se esse é exposto a luz e ao oxigênio. De acordo com Vichi *et al.* (2011), a dosagem de clorofila, feofitinas, xantofilas e carotenoides separadamente apresentam valores diferenciados pela influência de micro-organismos, temperatura de malaxação e teor de compostos voláteis.

De acordo com padrão de identidade e qualidade do azeite de oliva extra virgem no Brasil, o azeite de oliva não filtrado e o filtrado foram classificados como azeite de oliva extra virgem.

5.3 OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

A pesquisa realizada por observação direta ao microscópio ótico, modelo Olym- pikus 50, no aumento de 400 vezes, em lâminas temporárias, utilizando solução de azul de algodão como corante (Figura 16), permitiu observar características macroscópicas dos bolores e leveduras (KOIDIS; TRIANTAFILLOU; BOSKOU, 2008). Foi observado a presença de estruturas unicelulares apresentando brotamento, características de leveduras. A presença de hifas septadas característica de fungos filamentosos. Porém o uso do corante azul de algodão tem por finalidade visualizar o micélio vegetativo de fungos filamentosos e as características da célula de leveduras e o brotamento, não sendo uma análise conclusiva pra identificação.

Figura 16 – Observação ao microscópio ótico do sedimento corado com azul de algodão.



5.4 ANÁLISE SENSORIAL

Os atributos considerados significativos para descrever os azeites foram percebidos por no mínimo 30% do número de avaliadores, em pelo menos uma das amostras, e o resultado expresso na Tabela 8.

Tabela 8 – Número de menções dos atributos e defeitos sinalizados pelo painel nas amostras durante o armazenamento pelos provadores.

Amostra	Tempo de armazenamento (mês)							
	0		2		6		8	
	AF	ANF	AF	ANF	AF	ANF	AF	ANF
Frutado verde	2	-	2	-	4	-	5	-
Frutado maduro	5	2	6	2	8	2	6	3
Notas de banana	1	-	3	-	2	-	3	-
Amargo	6	4	6	3	8	3	7	2
Picante	7	3	7	3	9	3	8	1
Notas herbáceas	3	-	4	-	4	-	2	-
Avinagrado	-	5	-	4	-	3	-	3
Fermentado	-	6	-	5	-	5	-	6

Legenda: AF - Azeite filtrado / ANF - Azeite não filtrado.

Foi percebido, por todos os avaliadores, o defeito fermentado na amostra de azeite não filtrado nos tempos inicial, 0, após 2, 6 e 8 meses de armazenamento. Este defeito é expresso pelo contato do azeite de oliva recém-extraído com o sedimento resultante do processo de extração (CAYUELA *et al.*, 2015).

Considerando que as amostras partem de uma mesma extração, com o diferencial do processo de filtração como última etapa antes do envase, as amostras se apresentam expressando um frutado maduro, com amargor e picância presentes em todos os tempos avaliados.

O azeite filtrado se apresenta como frutado maduro, expressando notas suaves de banana, já que percebidas por um pequeno grupo de provadores e notas herbáceas por aproximadamente metade dos provadores, além do amargor e picância percebidos de forma crescente com o armazenamento. Somente para estas amostras, os descritores notas herbáceas e frutado verde foram selecionados como características presentes.

O azeite não filtrado naturalmente apresenta as mesmas características, todavia em menor intensidade quando comparado com o azeite filtrado. A percepção de frutado maduro é bem discreta, assim como a percepção do amargor e picância, e acontece de forma decrescente com o armazenamento (VICHI *et al.*, 2011). A presença do

sedimento é tida como fonte de defeito chamado tulha/borra, representado pelo termo fermentado, que se mantém durante o armazenamento. Os defeitos fermentado e avinagrado foram considerados para descrever estas amostras, porém não foram expressos nas amostras de azeite filtrado.

Os resultados demonstraram características de um azeite de oliva com defeito pelo contato com o sedimento, percebido por todos os avaliadores, o que indica que embora os parâmetros químicos classificassem o azeite não filtrado como extra virgem, o painel sensorial deste estudo não validou tal classificação.

A classificação ocorre pela presença de frutado e ausência de defeitos sensoriais. Mesmo que o azeite de oliva esteja com seus parâmetros físico-químicos dentro dos valores estabelecidos pela legislação a presença de defeitos determina a classificação do azeite como azeite extra virgem, virgem ou lampante.

6 CONCLUSÃO

A população de leveduras encontrada no azeite de oliva não filtrado foi predominante sobre a de bolores e bactérias. Em comparação à população de bolores, a enumeração das leveduras durante o armazenamento se apresentou em maior concentração e melhor desenvolvimento no meio MYGP pH 7,0, apesar da diminuição da contagem.

Durante o armazenamento os índices físico-químicos, apesar de pequenas variações, permaneceram dentro dos limites da legislação vigente, para azeite de oliva extra virgem. Porém o contato do azeite de oliva recém obtido com o sedimento levou ao desenvolvimento de defeitos sensoriais como avinagrado e de tulha/borra, que se mantêm durante o armazenamento, contribuindo para a redução da qualidade sensorial do azeite de oliva não filtrado apesar da presença de atributos considerados significativos como a percepção bem discreta de frutado maduro e de forma decrescente, com o armazenamento, amargor e picância.

Ainda que se tenha obtido através desse estudo a constatação da existência de uma microbiota ativa presente no sedimento do azeite de oliva recém obtido não filtrado, teve-se como limitação da pesquisa o fato de não terem sido identificadas as espécies presentes neste sedimento, principalmente pelo fato de existir uma microbiota que não é cultivável. A identificação das espécies existentes, conhecer o seu metabolismo e influência durante o armazenamento, consolidaria assim os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, C. L. M. *et al.* Validação do processo extrativo do óleo dos frutos de *Dipterix alata* Vogel para controle de qualidade e avaliação do potencial antioxidante. In: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS - CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS. *IV congresso de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Estadual de Goiás*. Goiás, 2004.
- ALMEIDA, C. A. Nogueira-de *et al.* Azeite de Oliva e suas propriedades em preparações quentes: revisão da literatura. *International Journal of Nutrology*, Thieme Revinter Publicações Ltda, v. 8, n. 02, p. 013–020, 2015.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4. ed. Champaign, USA: AOCS Press, 1990.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4. ed. Champaign, USA: AOCS Press, 1995.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions*. 6. ed. Champaign, USA: AOCS Press, 2009.
- ANDRADE, D. *et al.* Efeito da adição do micro talco natural na extração do azeite de oliva. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 10, n. 2, 2018.
- ANTONIASSI, R. *et al.* Otimização do Método Hartman e Lago de Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, 2018.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N. *et al.* Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 128, n. 2, p. 189–196, 2008.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N. *et al.* Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 160, n. 1, p. 42–49, 2012.
- BALLUS, C. A. *Chemical characterization and antioxidant capacity of extra-virgin olive oils from Brazil and other countries using electrophoretic, chromatographic and spectrometric techniques*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BERTONCINI, E. I.; TERAMOTO, J. R. S.; PRELA-PANTANO, A. Desafios para produção de azeite no Brasil. *Campinas: Infobibos*, 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm>. Acesso em: 21 jun 2019.

BERTONCINI, E. I.; TESTA, U. Análise sensorial de azeites de oliva. *Informe Agropecuário*, v. 35, n. 282, p. 58–65, 2014.

BONDAM, A. F. *et al.* Comparação de diferentes meios micológicos de uso geral para análise de alimentos na enumeração de *Aspergillus brasiliensis*: Quais os riscos e como proteger os celíacos. In: *Anais do 7º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR*. Porto Alegre: [s.n.], 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 30 de janeiro de 2012. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, Brasília, p. 5–8, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 18 de junho de 2018. Altera a Instrução Normativa nº 01, de 30 de janeiro de 2012, que dispõe sobre o Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, Brasília, p. 5, 2018.

CARDOSO, C. S.; DIAS, M. F. P. *Referências bibliográficas de documentos eletrônicos*. Pelotas: UFPEL, 2018. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/gpeia/files/2018/02/CADEIA-DA-OLIVICULTURA-1.pdf>>. Acesso em: 30 jun 2019.

CARDOSO, L. G. V. *Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveira introduzidas em Minas Gerais – Brasil*. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CARDOSO, L. G. V. *et al.* Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no sul de minas gerais–brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Universidade Estadual de Londrina, v. 31, n. 1, p. 127–135, 2010.

CARPENTER, R. P.; LYON, D. H.; HASDELL, F. A. *Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos*. Zaragoza: Acribia, 2002.

CASAL, S. *et al.* Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier, v. 48, n. 10, p. 2972–2979, 2010.

CAYUELA, J. A. *et al.* Sensory defects of virgin olive oil from a microbiological perspective. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, v. 43, n. 2, p. 227–235, 2015.

CAYUELA-SÁNCHEZ, J. A.; CABALLERO-GUERRERO, B. Fresh extra virgin olive oil, with or without veil. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, v. 83, p. 78–85, 2019.

CIAFARDINI, G. *et al.* Transfer of selected yeasts to oil through olive inoculation. *Italian Journal of Food Science*, v. 16, n. 1, 2004.

CIAFARDINI, G.; CIOCCIA, G.; ZULLO, B. A. Taggiasca extra virgin olive oil colonization by yeasts during the extraction process. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 62, p. 58–61, 2017.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. Effect of lipolytic activity of *Candida adriatica*, *Candida diddensiae* and *Yamadazyma terventina* on the acidity of extra-virgin olive oil with a different polyphenol and water content. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 47, p. 12–20, 2015.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A. Survival of micro-organisms in extra virgin olive oil during storage. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 19, n. 1, p. 105–109, 2002a.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A. Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, v. 75, n. 1-2, p. 111–118, 2002b.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A. Virgin olive oil yeasts: A review. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 70, p. 245–253, 2018.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 23, n. 1, p. 60–67, 2006.

COI. Análisis sensorial del aceite de oliva – Método de valoración organoléptica del aceite de oliva virgen. *CONSEJO OLEICOLA INTERNACIONAL*, Madrid, v. 15, 2007. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org>>. Acesso em: 27 abr 2019.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) n° 2568/91 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. 1991.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento Delegado (UE) n° 1830/2015 da Comissão de 8 de julho de 2015, que altera o Regulamento (CEE) n° 2568/91, relativo às

características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. 2015.

DI GIOVACCHINO, L. Technological aspects. In: HARWOOD, J AND APARICIO, R. *Handbook of olive oil*. Gaithersburg: ASPEN, 2000. p. 17–56.

EMPÓRIO DO AZEITE. *Azeite de oliva - Filtrado ou não filtrado?* Empório do Azeite, 2021. Disponível em: <<https://www.emporiodoazeite.com.br/blog/azeite-de-oliva-filtrado-ou-nao-filtrado>>. Acesso em: 22 mar 2021.

FAIA, A. M. *Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) — Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations – Statistics Division*. FAOSTAT, 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 25 abr 2019.

FARIA-MACHADO, A. F. *et al.* Qualidade de azeites de oliva extravirgens produzidos no Brasil. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA. *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. Lisboa, 2018.

FERNANDES, G. D. *Detection of sophisticated fraud in olive oil using official methodologies and DNA molecular markers*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

FREGAPANE, G. *et al.* Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Wiley Online Library, v. 108, n. 2, p. 134–142, 2006.

FREITAS, D. C. *Caracterização fenólica de azeites virgens provenientes da cultivar galega vulgar e validação do método por HPLC*. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) — Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Beja, Beja, 2013.

GARGOURI, B.; ZRIBI, A.; BOUAZIZ, M. Effect of containers on the quality of Chemlali olive oil during storage. *Journal of Food Science and Technology*, Springer, v. 52, n. 4, p. 1948–1959, 2015.

GENOVESE, A. *et al.* Olive oil phenolic compounds affect the release of aroma compounds. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 181, p. 284–294, 2015.

- GIULIANI, A.; CERRETANI, L.; CICHELLI, A. Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences. *Critical reviews in food science and nutrition*, Taylor & Francis, v. 51, n. 7, p. 678–690, 2011.
- GUERRINI, S. *et al.* Investigation on microbiology of olive oil extraction process. *Italian Journal of Food Science*, v. 27, p. 236–247, 2015.
- HOUSHIA, O. J. *et al.* Effect of olive oil adulteration on peroxide value, delta-K and on the acidity Nabali-Baladi olive oil quality. *Delta (Δ)*, v. 266, p. k274, 2014.
- IAL. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- JORGE, R. O. *Caracterização de azeites virgem extra “gourmet” variedades e “blends” comercializados no mercado do Rio Grande do Sul*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) — Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- JORGE, Z. L. C. *Análise sensorial, consumo e qualidade de azeites de oliva extra virgem*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) — Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.
- KALUA, C. M. *et al.* Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 100, n. 1, p. 273–286, 2007.
- KIRITSAKIS, A.; TURKAN, K. M.; KIRITSAKIS, K. Olive oil. *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, Wiley Online Library, p. 1–38, 2020.
- KOIDIS, A.; TRIANTAFILLOU, E.; BOSKOU, D. Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils. *European journal of lipid science and technology*, Wiley Online Library, v. 110, n. 2, p. 164–171, 2008.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier, 1998. 320–351 p.
- LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M.; ROMANO, L. H. Avaliação das insaturações de azeites extras virgens pelo índice de iodo (método de wijs). *Revista Saúde em Foco*, p. 17–30, 2018.
- LERCKER, G.; CARAMIA, G. Composizione ed aspetti salutistici dell’olio di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, v. 87, p. 147–169, 2010.

LUTZ, A. Normas analíticas do instituto adolfo lutz. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, v. 2, 1985.

MACHADO, I. K. *Avaliação Sensorial de Azeites de Oliva*. Porto Alegre: Trabalho apresentado ao Seminário Técnico de Olivicultura, 2017.

MAPA. *Painel sensorial de azeite de oliva do LFDA-RS obtém reconhecimento internacional inédito no Brasil*. Brasília: Governo Federal, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/painel-sensorial-de-azeite-de-oliva>>. Acesso em: 25 fev 2022.

MARQUES, C. J. S. *Análise comparativa de azeites virgem extra de vários DOP: caracterização reológica, físico-química e cromatográfica*. 139 p. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) — Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do rs, brasil. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 537–548, 2012.

MELLO, M. A. M. F. *Avaliação das Propriedades de Óleos Vegetais visando a Produção de Biodiesel*. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

MODOLO, J. S. *Quantificação de estigmatadienos em azeite de oliva (Olea europea L.) por cromatografia em fase gasosa*. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

NOGUEIRA, F. *Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos*. 97 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) — Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança, 2012.

OLIVEIRA, A. F. d.; ABRAHÃO, E. Botânica e morfologia da oliveira (*Olea europaea L.*). *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 27, n. 231, p. 13–17, 2006.

OLIVEIRA, M. C. d. *et al.* Características fenológicas e físicas e perfil de ácidos graxos em oliveiras no sul de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, SciELO Brasil, v. 47, p. 30–35, 2012.

- PALUMBO, M.; HARRIS, L. J. Microbiological food safety of olive oil: A review of the literature. *US Davis Olive Center Report*, 2011.
- PERES, M. F.; MARTINS, L. L.; DIAS, S. F. Otimização da extração de azeite de azeitona 'cobrançosa' por adição de adjuvantes tecnológicos. *VI Simpósio Nacional de Olivicultura*, APH, p. 375–380, 2012.
- ROMO-SÁNCHEZ, S. *et al.* Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 27, n. 4, p. 487–492, 2010.
- SÁ, D.; CAMPOS, R. d. S.; FARIA-MACHADO, A. F. de. Aceitação de Azeites de Oliva da Região da Mantiqueira (MG): Entendendo Consumidor e Azeite Brasileiros. *Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documentos (INFOTECA-E)*, Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2019., 2019.
- SAATKAMP, K. E. *Comparação de diferentes meios de cultura utilizados como substratos na contagem de bolores e leveduras no controle da qualidade de erva-mate*. Graduação em Ciências Biológicas na área de Microbiologia — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.
- SANTOS, C. S. P. *et al.* Effect of cooking on olive oil quality attributes. *Food Research International*, Elsevier, v. 54, n. 2, p. 2016–2024, 2013.
- SERVILI, M. *et al.* Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 3, n. 1, p. 1–23, 2014.
- SILVA, T. *et al.* Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT-Food Science and Technology*, Elsevier, v. 44, n. 6, p. 1349–1354, 2011.
- TEIXEIRA, P. R. J. *Contributo para a caracterização do azeite extraído na área de influência da Cooperativa dos Olivicultores de Valpaços*. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) — Escola Superior Agrária, Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2015.
- VICHI, S. *et al.* The activity of healthy olive microbiota during virgin olive oil extraction influences oil chemical composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 59, n. 9, p. 4705–4714, 2011.
- WREGGE, M. S. *et al.* Regiões de clima homogêneo no Brasil para produção comercial de oliveiras. *Revista Brasileira de Climatologia*, Embrapa Florestas, Curitiba, v. 16, p. 142–158, 2015a.

WREGGE, M. S. *et al.* Distribuição potencial de oliveiras no brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, SciELO Brasil, v. 37, p. 656–666, 2015b.

XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T. G. Colloidal structures in natural oils. *Current opinion in colloid & interface science*, Elsevier, v. 15, n. 1-2, p. 55–60, 2010.

ZANONI, B. *et al.* Investigation on microbiology of olive oil extraction process. *Italian Journal of Food Science*, v. 27, n. 2, p. 236–247, 2015.

ZULLO, B. A.; CIAFARDINI, G. Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 25, n. 8, p. 970–977, 2008.

ZULLO, B. A.; CIAFARDINI, G. Changes in Physicochemical and Microbiological Parameters of Short and Long-Lived Veiled (Cloudy) Virgin Olive Oil Upon Storage in the Dark. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Wiley Online Library, v. 120, n. 1, p. 1700309, 2018.

ZULLO, B. A.; CIAFARDINI, G. Evaluation of physiological properties of yeast strains isolated from olive oil and their in vitro probiotic trait. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 78, p. 179–187, 2019.

ZULLO, B. A.; CIOCCIA, G.; CIAFARDINI, G. Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 27, n. 8, p. 1035–1042, 2010.

ZULLO, B. A.; CIOCCIA, G.; CIAFARDINI, G. Effects of some oil-born yeasts on the sensory characteristics of italian virgin olive oil during its storage. *Food Microbiology*, Elsevier, v. 36, n. 1, p. 70–78, 2013.

ANEXOS

ANEXO I - FICHA CONTENDO OS DESCRITORES PARA A ANÁLISE SENSORIAL

ANEXO I

Ficha contendo os descritores para a ANÁLISE SENSORIAL

Vocabulário específico usado na categorização do azeite de oliva extra virgem.
Padrão COI / T.20 / Doc. Nº. 4 "Análise Sensorial: Vocabulário Básico Geral" / COI-T20-Doc.-
15- REV-10-2018-Eng.pdf.

TERMO DESCRITOR	DEFINIÇÃO
Frutado	Conjunto de sensações olfativas características do óleo, que depende da variedade das azeitonas e provém de frutos são e frescos, verdes ou maduros. É percebido diretamente e / ou através da parte de trás do nariz (via retronasal).
Frutado verde	Conjunto de sensações olfato-gustativas características do azeite que recorda as frutas verdes, dependente da variedade de azeitonas, e que procede de frutos verdes são e frescos. É percebido diretamente e / ou através da parte de trás do nariz (via retronasal).
Frutado maduro	Conjunto de sensações olfato-gustativas características do azeite que recorda as frutas maduras, dependente das variedades de azeitonas e que procedem de frutos são e frescos. É percebido diretamente e / ou através da parte de trás do nariz (via retronasal).
Amargo	Gosto primário característico do óleo obtido a partir de azeitonas verdes ou azeitonas em amadurecimento. É percebido nas papilas circunvaladas na região "V" da língua.
Picante	Sensação tátil picante característica dos óleos produzidos no início do ano-safra, principalmente a partir de azeitonas ainda verdes. Pode ser percebida em toda a cavidade bucal, principalmente na garganta.
Tulha (Atrojado) / Borrás	Aroma característico do óleo obtido de azeitonas empilhadas ou armazenadas em condições não adequadas, proporcionando um estágio avançado de fermentação anaeróbica ou de óleo deixado em contato com o sedimento de decantação sofrendo também um processo de fermentação anaeróbica.
Mofa-úmido-terroso	Sabor do azeite produzido com azeitonas que permaneceram amontoadas com umidade por vários dias e desenvolveram fungos e leveduras; ou obtido de azeitonas sujas, não lavadas, as quais possuíam terra ou lama.
Avinhado - avinagrado	Sabor característico de certos óleos que recorda vinho ou vinagre.

ANEXO II - FICHA DO CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL PARA O PREENCHIMENTO DOS AVALIADORES

ANEXO II

Ficha para o preenchimento dos avaliadores

COI/T.20/Doc. No15/Rev. 10
page 13

Figure 1

PROFILE SHEET FOR VIRGIN OLIVE OIL INTENSITY OF PERCEPTION OF DEFECTS

Fusty/muddy sediment	_____
Musty/humid/earthy	_____
Winey/vinegary acid/sour	_____
Frostbitten olives (wet wood)	_____
Rancid	_____
Other negative attributes:	_____
Descriptor:	Metallic <input type="checkbox"/> Dry hay <input type="checkbox"/> Grubby <input type="checkbox"/> Rough <input type="checkbox"/> Brine <input type="checkbox"/> Heated or burnt <input type="checkbox"/> Vegetable water <input type="checkbox"/> Esparto <input type="checkbox"/> Cucumber <input type="checkbox"/> Greasy <input type="checkbox"/>

INTENSITY OF PERCEPTION OF POSITIVE ATTRIBUTES

Fruity	_____
	Green <input type="checkbox"/> Ripe <input type="checkbox"/>
Bitter	_____
Pungent	_____

<u>Name of taster:</u>	<u>Taster code:</u>
<u>Sample code:</u>	<u>Signature:</u>
<u>Date:</u>	
<u>Comments:</u>	

ANEXO III - FICHA PARA O PREENCHIMENTO DOS AVALIADORES ADAPTADA PELA AUTORA

ANEXO III FICHA PARA O PREENCHIMENTO DOS AVALIADORES

Marque todas as palavras que você considera apropriada para descrever as amostras:

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE AZEITE DE OLIVA		TESTE 1				TESTE 2			
TERMO DESCRITOR		163	289	632	744	972	853	534	618
Frutado	Frutado verde								
	Frutado maduro								
Notas de banana									
Notas herbáceas									
Notas florais									
Notas de frutas cítricas									
Notas de maçã									
Notas de pepino									
Notas de cacau									
Amargo									
Picante									
Tulha (Atrojado) / Borrás									
Mofo-úmido-terroso									
Avinhado - avinagrado									
Ácido - azedo									
Azeitonas congeladas (madeira úmida)									
Metálico									
Rançoso									

Nome.....

Data

ANEXO IV - FLUXOGRAMA ADAPTADO DA EXTRAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA UTILIZADO NA PESQUISA

ANEXO IV - FLUXOGRAMA ADAPTADO DA EXTRAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA UTILIZADO NA PESQUISA

