



Efeitos da Presença de Gafa na Azeitona nos Compostos Bioativos do Azeite

Cecília Maria Marcelo da Silva Gouveia

Orientadores

Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres

Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Castelo Branco do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronómica, realizada sob a orientação científica da Professora Adjunta Maria de Fátima Pratas Peres, do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Professora Associada com Agregação Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Maio 2023

Composição do júri

Presidente do júri

Doutor Paulo Alexandre Justo Fernandez

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Vogais

Arguente:

Doutor João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Orientadores:

Doutora Maria de Fátima Pratas Peres

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Dedicatória

Em memória do meu pai...

Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, quero manifestar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar agradeço às minhas orientadoras, Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres e Professora Doutora Suzana Ferreira-Dias, pela pronta disponibilidade que mostraram para a orientação científica deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres pelo acompanhamento sistemático deste trabalho e pelo seu envolvimento incondicional na supervisão e revisão desta dissertação, pelos seus conselhos, pelo seu espírito crítico pelos seus ensinamentos, assim como pela paciência e amizade demonstradas ao longo de todo o tempo que temos trabalhado juntas.

À Professora Doutora Suzana Ferreira-Dias pela orientação, ajuda e dedicação no acompanhamento e revisão deste trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Castelo Branco, nomeadamente, à Escola Superior Agrária de Castelo Branco por me ter cedido todos os meios necessários para a realização deste trabalho.

Ao Projeto ModOliveColl por me ter proporcionado integrá-lo para realizar este estudo.

À minha colega Eng. Conceição Vitorino, pela imensa ajuda que me concedeu em toda a parte experimental deste trabalho.

Às minhas colegas e amigas Dra. Maria Helena Martins e Eng. Natália Roque que desde o início, prontamente se disponibilizaram para me prestar ajuda, de uma forma que já não julgava ser possível.

À estagiária Beatriz Azinheira, pela sua ajuda e apoio moral.

À Dra. Elisa Ribeiro e à Dra. Fátima Graça pelas suas palavras de incentivo e motivação que me ajudaram a continuar e a não desistir.

À minha filha Jéssica pelas suas palavras de encorajamento nos meus momentos de maior desânimo e pela confiança que depositou em mim desde que comecei este trabalho.

Ao meu filho Ricardo, pela sua preciosa ajuda, pela sua enorme paciência, pela sua inigualável generosidade e por ter a qualidade rara de fazer tudo parecer mais fácil.

Ao António que provavelmente não terá ideia de quão importante foi e da força que me deu para que a redação deste trabalho se tornasse possível, especialmente quando o cansaço e a desmotivação pareciam superar tudo o resto. Espero que estas palavras permitam evidenciar o quanto significou.

A todas estas pessoas, espero, também, que estas palavras possam retribuir um pouco daquilo que me deram.

O meu sincero reconhecimento a todas.

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto ModOliveColl (referência: PTDC/ASP-PLA/28547/2017), aprovado no âmbito do Aviso n.º 02/SAICT/2017 – Sistema de Apoio à Investigação Científica e Tecnológica (SAICT) – Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico (IC&DT) e financiado por fundos nacionais, através da FCT, I. P. Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Resumo

Uma das doenças fúngicas mais relevantes da oliveira em Portugal é a antracnose, também conhecida por "gafa", que tem consequências negativas na quantidade e na qualidade do azeite. O presente estudo incide sobre o efeito da presença de gafa nos frutos das cultivares 'Galega Vulgar' e 'Cobrançosa', no teor de compostos bioativos, nomeadamente na composição em fenóis, hidroxitirosol (Htyr) e seus derivados (alegação de saúde) de azeites extraídos de azeitonas colhidas em outubro e novembro em três anos consecutivos (2019-2021). Os frutos foram colhidos em Castelo Branco em olivais de sequeiro sem tratamentos fitossanitários. Imediatamente após a colheita, o azeite foi extraído num sistema Abencor. Os critérios de qualidade foram avaliados por espectroscopia NIR, os fenóis totais e os pigmentos por espectroscopia VIS. O perfil fenólico foi avaliado por HPLC-UV, os derivados totais de Hyt e tirosol (Tyr) por HPLC-DAD. Os resultados dos critérios de qualidade mostram que os azeites Galega extraídos de azeitonas num estado avançado de maturação (IM > 5) e com maior incidência de gafa apresentam não conformidade para as categorias Azeite Virgem Extra (AVE) e Azeite Virgem (AV), pela acidez elevada e notas sensoriais negativas acompanhadas de um quase desaparecimento de oleaceína. Pelo contrário, nos azeites Cobrançosa extraídos de frutos com elevada incidência de gafa, não foram observados defeitos sensoriais. Apesar da diminuição de todos os atributos positivos associados à cultivar, como os teores de oleaceína e oleocantal, os critérios de qualidade mantiveram-se em conformidade com a categoria AVE. O teor total de Htyr e Tyr (> 5,42) permite a utilização da alegação de saúde no rótulo dos azeites Cobrançosa. Nos azeites Galega, apenas os das duas primeiras colheitas de 2019 contêm teores suficientes para a alegação. Assim, a presença de gafa nas azeitonas pode comprometer a classificação de AVE e AV, especialmente em cultivares suscetíveis à doença.

Palavras-chave

Colletotrichum spp., alegação de saúde, compostos bioativos, maturação.

Abstract

The Effects of anthracnose in olive on the bioactive compounds of olive oil

One of the most relevant fungal diseases of the olive tree in Portugal is anthracnose, also known as 'gafa', which has negative effects on the yield and quality of the olive oil. The present study focuses on the effect of olive anthracnose on the content of bioactive compounds, namely on the composition in phenols, namely hydroxytyrosol (Htyr) and its derivatives (health claim) in olive oils extracted from 'Galega' and 'Cobrançosa' cultivar olive, harvested in October and November of three consecutive years (2019-2021). The olives were harvested in Castelo Branco (Center of Portugal) in organic rainfed orchards and immediately extracted in an Abencor system. The quality criteria were evaluated by NIR spectroscopy and total phenols and pigments by VIS spectroscopy. Phenolic profile was evaluated by HPLC-UV, total Htyr and tyrosol (Tyr) derivatives by HPLC-DAD. The results of the quality criteria show that Galega olive oils extracted from olives in advanced ripening stage (RI > 5) and with a high anthracnose incidence show no conformity for the Extra Virgin Olive Oil (EVOO) and Virgin Olive Oil (VOO) categories, with high acidity values and negative sensory notes accompanied by disappearance of oleacein. Conversely, Cobrançosa olive oils extracted from fruit with high anthracnose incidence, no sensory defects were observed. However, despite a decrease in all the positive attributes associated with the cultivar, namely in oleacein and oleocanthal contents, quality criteria were still in accordance with the EVOO category. The total Htyr and Tyr content (> 5.42) allows the use of the health claim on the label of the Cobrançosa olive oils. In Galega olive oils, only those of the first two harvests of 2019 contained sufficient contents to fulfill the health claim. Thus, the presence of anthracnose in the olives may compromise the EVOO and VOO classification, especially in cultivars susceptible to the disease.

Keywords

Colletotrichum spp., health claim, bioactive compounds, ripening.

Índice

Resumo	XI
Abstract.....	XIII
Índice	XV
Índice de figuras	XVII
Lista de tabelas.....	XVIII
1. Introdução.....	1
2. O agente patogénico – <i>Colletotrichum spp</i>.....	3
2.1. Distribuição geográfica	3
2.2. Fatores que influenciam o seu aparecimento.....	5
2.2.1. <i>Condições ambientais</i>	5
2.3.2. <i>Maturação dos frutos</i>	7
2.3.3. <i>Suscetibilidade da cultivar</i>	9
2.3.4. <i>Características do fruto como barreira física</i>	11
2.3.5. <i>Compostos fenólicos como barreiras químicas</i>	13
3. Gafa e a qualidade do azeite.....	15
3.1. Efeitos da gafa nos critérios de qualidade do azeite.....	17
3.2. Efeito da gafa no perfil de ácidos gordos do azeite	19
3.3. Efeitos da gafa nos compostos bioativos do azeite	19
4. Estratégias para o combate à doença	22
4.1. Meios de luta cultural	22
4.2. Meios de luta genética	22
4.3. Meios de luta biológica	23
4.4. Meios de luta química	23
5. Material e Métodos.....	24
5.1. Material	24
5.2. Métodos.....	24
5.2.1. <i>Caracterização dos frutos</i>	24
5.2.2. <i>Extração do azeite</i>	24
5.2.3. <i>Critérios de qualidade e ácidos gordos principais</i>	24

5.2.4. Compostos fenólicos totais.....	25
5.2.5. Alegações de saúde.....	25
5.2.6. Perfil de compostos fenólicos.....	26
5.2.7. Pigmentos clorofilinos.....	27
5.2.8. β -caroteno.....	27
5.2.9. Estabilidade oxidativa	27
5.2.10. Tratamento estatístico dos resultados.....	28
6. Resultados e Discussão	29
6.1. Caracterização dos frutos.....	29
6.2. Caracterização dos azeites.....	31
6.2.1. Critérios de qualidade.....	31
6.2.2. Compostos fenólicos totais e alegação de saúde	34
6.2.3. Perfil de compostos fenólicos.....	36
6.2.4. Perfil de ácidos gordos principais.....	39
6.2.5. Estabilidade oxidativa	40
6.2.6. Pigmentos clorofilinos e β -caroteno	41
6.2.7. Composição esterólica, esteróis totais e teor de eritrodiol e uvaol	43
7. Conclusões	44
Referências.....	46

Índice de figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies do género <i>Colletotrichum</i> no mundo, na Bacia Mediterrânica e em Portugal.....	4
Figura 2 - Ciclo de vida e processo de infeção do fungo do género <i>Colletotrichum</i> spp.....	8
Figura 3 - Valores médios mensais de temperatura e precipitação registados na região de Castelo Branco nos anos de 2019, 2020 e 2021 (Projeto Modolive (2019, 2020); IPMA, 2021).....	30
Figura 4 - Fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol nos azeites Galega e Cobrançosa (mg kg ⁻¹) avaliados nas três campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios ± desvio padrão).....	34
Figura 5 - Alegação de saúde (Htyr+Tyr) nos azeites Galega e Cobrançosa (mg Tyr/20g de azeite) avaliados nas três campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios ± desvio padrão).....	36
Figura 6 - Perfil fenólico de azeites Galega (HPLC-UV-280 nm).	37
Figura 7 - Estabilidade oxidativa dos azeites Galega e Cobrançosa vs. fenóis totais avaliados em 2020 e 2021(valores médios).	41
Figura 8 - (A) Teor de pigmentos clorofilinos (mg feofitina kg ⁻¹) e (B) teor de β-caroteno (mg β-caroteno kg ⁻¹) dos azeite Galega e Cobrançosa avaliados em 2020 e 2021 (valores médios ± desvio padrão).....	42

Lista de tabelas

Tabela 1 - Temperaturas ótimas de germinação, esporulação, crescimento e infecção de várias espécies de fungos do género <i>Colletotrichum</i> spp.....	6
Tabela 2 - Classificação de cultivares portuguesas segundo a sua suscetibilidade à gafa.	10
Tabela 3 – Referências bibliográficas e resultados relativos aos efeitos de <i>Colletotrichum</i> spp. inoculado artificialmente em azeitonas sobre alguns compostos químicos do azeite.....	16
Tabela 4 - Programa de gradiente utilizado para determinação do perfil fenólico.	26
Tabela 5 - Incidência de gafa e mosca-da-zeitona (%) nas azeitonas das cultivares ‘Galega’ e ‘Cobrançosa’ e respetivos índices de maturação avaliados nas 3 campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021).	29
Tabela 6 - Critérios de qualidade (acidez, índice de peróxido (IP), K_{232} , K_{270} e exame organolético) nos azeites Galega avaliados nas 3 campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).	31
Tabela 7 - Critérios de qualidade (acidez, índice de peróxido (IP), K_{232} , K_{270} e exame organolético) nos azeites Cobrançosa avaliados nas três campanhas sucessivas (2019,2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).....	32
Tabela 8 - Compostos fenólicos maioritários identificados por HPLC nos azeites Galega (quantificação de acordo com COI (2017) em mg de tirosol/kg, para quatro tempos de colheita e em dois anos consecutivos (2019 e 2020) (valores médios de quatro cromatogramas, 2 amostras independentes).....	37
Tabela 9 - Compostos fenólicos maioritários identificados por HPLC nos azeites Cobrançosa (quantificação de acordo com COI (2017) em mg tirosol/kg, para quatro tempos de colheita e em dois anos consecutivos (2019 e 2020) (valores médios de quatro cromatogramas, 2 amostras independentes).....	38
Tabela 10 - Ácidos gordos principais (%) (C18:1, C18:2, C16:0 e C18:0) por ordem de importância identificados por NIR nos azeites Galega para quatro tempos de colheita e em três anos consecutivos (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).....	39
Tabela 11 - Ácidos gordos principais (%) (C18:1, C18:2, C16:0 e C18:0) por ordem de importância identificados por NIR nos azeites Cobrançosa, para quatro tempos de colheita e em três anos consecutivos (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).	40
Tabela 12 - Composição esterólica (%), esteróis totais (mg kg ⁻¹) e eritrodiol e uvaol (%) de azeites Galega e Cobrançosa (T1 e T4 de 2020).	43

1. Introdução

As alterações climáticas estão, cada vez mais, a afetar o ecossistema atual e a incidência e a reemergência de pragas e doenças têm sido atribuídas, em parte, aos fenómenos meteorológicos extremos que se têm registado nas últimas décadas (Braga & Pinto, 2009).

A gafa ou antracnose, causada por diversas espécies do género *Colletotrichum*, é a doença fúngica da oliveira com maior impacto económico em Portugal. A incidência e a severidade da doença variam de acordo com a suscetibilidade varietal, as condições meteorológicas e a virulência do agente patogénico (Leoni *et al.*, 2018).

Em Portugal, a gafa é maioritariamente causada pelo complexo *C. acutatum* s.l. e esporadicamente pelo complexo *C. gloeosporioides*. Dentro do complexo *C. acutatum*, *C. nymphaeae* é a espécie dominante, seguida por *C. godetiae* e *C. acutatum* s.s. (Talhinhas *et al.*, 2005). As epidemias mais severas têm ocorrido principalmente em olivais tradicionais no centro e no sul do país (Loureiro *et al.*, 2018), com grande impacto na quebra de rendimento e de qualidade do produto final. Estas perdas resultam muitas vezes da existência de condições agroecológicas específicas, tais como o uso de cultivares suscetíveis em detrimento de outras mais resistentes, e a abundância de reservatórios de inóculo, associados a humidade e precipitação elevadas, assim como à ocorrência de temperaturas amenas durante o outono (Talhinhas *et al.* 2011).

A gafa desenvolve-se à medida que os frutos amadurecem, causando apodrecimento, perda de massa e queda das azeitonas. A doença tem também um efeito depreciativo na qualidade do azeite, refletindo-se nas suas características físico-químicas e sensoriais (Moral *et al.*, 2014; Gouvinhas *et al.*, 2019; Leoni *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2021).

As alterações sensoriais e químicas do azeite são complexas, sendo, por isso, muito difícil reconhecer-lhes uma única causa/efeito. Para além da antracnose, múltiplas pressões bióticas podem causar tais alterações, nomeadamente, a mosca-da-zeitona (Talhinhas *et al.*, 2018) que nos olivais portugueses são os dois agentes bióticos mais frequentes e geralmente indissociáveis.

Uma das principais características químicas do azeite obtido de azeitonas afetadas pela gafa é a diminuição do respetivo teor fenólico (Peres *et al.*, 2021). Os compostos fenólicos estão associados à qualidade do azeite, especialmente às características sensoriais e às propriedades bioativas benéficas para a saúde. Com base em evidência científica, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) reconheceu, em 2011, que os polifenóis do azeite, concretamente o hidroxitirosol e seus derivados (e.g. tirosol), têm um “efeito protetor contra o stresse oxidativo sobre os lípidos no sangue”, ficando legalmente autorizada a utilização desta alegação de saúde na rotulagem do azeite.

Outro composto do azeite detentor de propriedades bioativas e relacionados com a qualidade é o β -caroteno. No azeite, este tipo de pigmento contribui para a cor amarelo-dourado, muito apreciada pela maioria dos consumidores, e para a sua proteção contra reações de oxidação durante o armazenamento. Por outro lado, o β -caroteno é de grande importância nutricional pela sua atividade provitamina A e devido às suas propriedades bioativas, em especial pela sua atividade antioxidante, com efeitos benéficos para a saúde, sendo considerado uma substância funcional. Alguns estudos referem que os carotenoides ingeridos através da dieta contribuem para a prevenção de doenças oculares, para a

melhoria da funcionalidade dos sistemas imunitário e reprodutivo e para a prevenção de determinadas patologias cardiovasculares e oncológicas (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014; Barba *et al.*, 2006).

O presente estudo realizou-se na região de Castelo Branco, durante três campanhas (2019, 2020 e 2021), tendo como objetivo avaliar a resposta das cultivares Galega e Cobrançosa à gafa nos compostos bioativos dos azeites obtidos de frutos em diferentes estados de maturação, com especial destaque nos compostos fenólicos. Concretamente, pretendeu avaliar o impacto desta doença na possibilidade de azeites provenientes de frutos atacados poderem exibir a alegação de saúde alusiva aos polifenóis do azeite na rotulagem. Neste sentido, avaliou-se a concentração de hidroxitirosol (Htyr) e tirosol (Tyr) em azeites extraídos de azeitonas das cultivares ‘Galega Vulgar’ e ‘Cobrançosa’, com diferentes níveis de maturação e de incidência da antracnose, colhidas quinzenalmente em outubro e novembro em olivais de sequeiro e sem quaisquer tratamentos fitossanitários. Em cada azeite, estudaram-se também os critérios de qualidade (Acidez, IP, K_{232} e K_{270} e análise organolética), a estabilidade oxidativa a composição em ácidos gordos maioritários, o teor de fenóis totais, o teor de pigmentos clorofilinos e de β -caroteno e determinou-se o perfil de compostos fenólicos e o perfil esterólico.

2. O agente patogénico - *Colletotrichum spp*

2.1. Distribuição geográfica

A fácil adaptação da oliveira a qualquer tipo de solo e clima, aliada à recente procura por produtos do olival, fomentou o consumo de azeite e de azeitona de mesa, levando à expansão da cultura em todo o mundo, incluindo a países sem tradição em olival (EUA, Brasil, Argentina, Austrália, China e México) (Cacciola *et al.*, 2012).

Estudos recentes referem que, devido às alterações climáticas dos últimos anos, às novas práticas culturais e à introdução de novas cultivares, aumentaram as doenças causadas por agentes patogénicos, nunca registados em determinadas zonas geográficas (Chattaoui *et al.*, 2016), tornando-se um problema ameaçador para todo o setor olivícola.

Há vários anos que a produção de azeite é gravemente prejudicada pela gafa da oliveira, uma doença causada por várias espécies de fungos do género *Colletotrichum*. A doença foi reportada a nível mundial pela primeira vez em Portugal, há mais de um século (1899) e foi denominada de 'gafa' (Almeida, 1899). Anos depois, a expansão da doença a outras zonas do globo trouxe dúvidas sobre a identificação e classificação taxonómica do seu agente causal.

Os avanços das técnicas de biologia molecular permitiram esclarecer que *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, anteriormente classificadas como espécies, englobavam isolados muito distintos fenotípica e genotipicamente e, por isso, não podiam ser consideradas espécies, mas complexos de espécies (Chattaoui *et al.*, 2016). Por isso é muito frequente recorrer-se aos conceitos de *sensu lato* (s.l.) e de *sensu stricto* (s.s.) introduzidos por Martín & García-Figueres (1999), para distinguir os complexos e as espécies, respetivamente. Atualmente, sabe-se que estes dois complexos compreendem 13 espécies (Schena *et al.*, 2014) e que, deste conjunto, oito são consideradas patogénicas - *C. gloeosporioides sensu stricto* (s.s.), *C. theobromicola*, *C. acutatum* (s.s.), *C. nymphaeae*, *C. fiorinae*, *C. godetiae* e *C. simondsii* enquanto as restantes *C. aenigma*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. queenslandicum*, *C. siamense*, *C. karstii* e *C. alienum* não evidenciam patogenicidade (Talhinhas *et al.*, 2018).

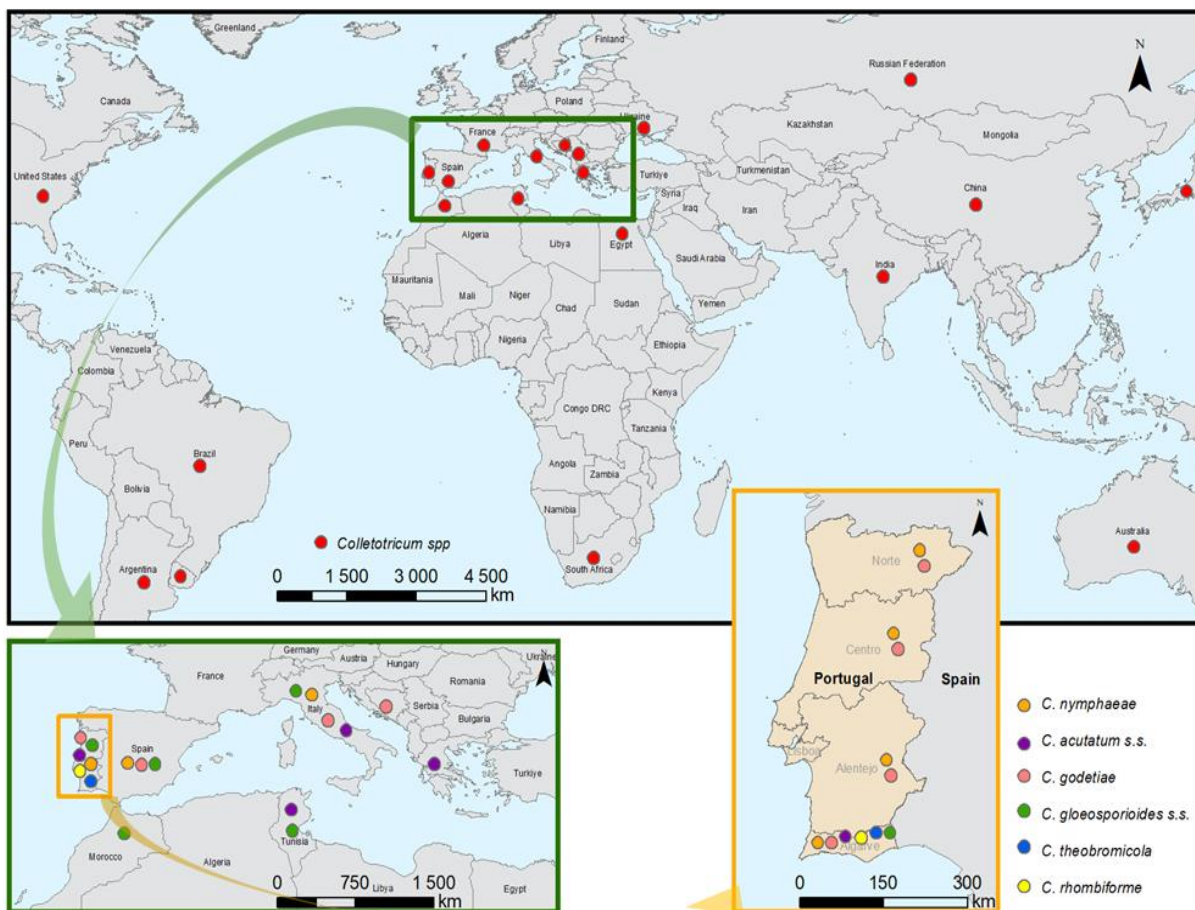
O complexo *C. gloeosporioides* mostrou ser um importante agente causal da gafa, contudo, raramente é associado a surtos epidémicos da doença. Por outro lado, o complexo *C. acutatum* parece ter uma prevalência superior e maior virulência, apontado por isso como sendo o complexo com maior capacidade de promover ataques mais severos (Schena *et al.* 2014).

Desde a sua primeira identificação, foram sinalizados inúmeros surtos de gafa o que mostra bem a sua elevada importância (Cacciola *et al.*, 2012). A gafa é bastante frequente na Europa, principalmente em Espanha, Portugal, Grécia e Itália. No resto do mundo há registos da doença no Japão, Uruguai, Argentina, China, Austrália, Califórnia, Nova Zelândia, África do Sul e Brasil, entre outros (Figura 1).

A espécie *C. nymphaeae*, parece estar restrita sobretudo à Península Ibérica (Talhinhas *et al.*, 2018) mas à escala global, as espécies reconhecidas como principais agentes causadoras de gafa são *C. acutatum* (s.s.), *C. godetiae* e *C. nymphaeae* (Mosca *et al.*, 2014). Na

Bacia Mediterrânea e em Portugal, as populações de fungos estão em evolução, notando-se a presença de *C. acutatum* (s.s.) cada vez mais frequente onde *C. godetiae* é dominante (Figura 1).

Em Portugal, os episódios de gafa são muito frequentes e são causados, maioritariamente, pelo complexo *C. acutatum* (97 %) e esporadicamente pelo complexo *C. gloeosporioides* (3 %). Dentro do complexo *C. acutatum*, *C. nymphaeae* é a espécie dominante (80% dos isolados), seguida por *C. godetiae* (12% dos isolados) e *C. acutatum* (s.s.) (3-4 % dos isolados) (Loureiro *et al.* 2018).



Fonte: Adaptado de Talhinas *et al.* (2018).

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies do género *Colletotrichum* no mundo, na Bacia Mediterrânea e em Portugal

A nível nacional (Figura 1) *C. nymphaeae* é dominante praticamente em todas as regiões do país, à exceção de Trás-os-Montes, onde *C. godetiae* foi identificado como a espécie mais frequente (Talhinas *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2018). A sul do país foram identificadas quatro espécies diferentes (*C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. godetiae* e *C. acutatum* (s.s.)), com níveis de frequência semelhantes (Talhinas *et al.*, 2018).

Relativamente à virulência, *C. nymphaeae* e *C. acutatum* (s.s.) são as espécies mais virulentas, enquanto *C. godetiae* e *C. fioriniae* apresentam virulência intermédia e *C. gloeosporioides* (s.s.) a menos agressiva (Loureiro *et al.*, 2018).

2.2. Fatores que influenciam o seu aparecimento

Atualmente, devido ao aumento de plantações de oliveiras e à sua expansão por todo o mundo, as pragas e as doenças associadas ao olival também se vão propagando por todas as áreas de produção (Bueno & Jones, 2002).

A gafa ou antracnose é uma das doenças do olival mais frequentes em Portugal, responsável por graves perdas de rendimento e qualidade do azeite, causada por fungos do género *Colletotrichum*, cuja incidência é proporcional à quantidade de frutos infetados (Gouvinhas *et al.*, 2019; Peres *et al.*, 2021).

Do ponto de vista dos agentes causais da doença, é fundamental compreender o modo de infeção provocado pelos fungos do género *Colletotrichum*, ou seja, a forma como superam as barreiras físicas e, paralelamente, estabelecem uma relação trófica com o hospedeiro (Gomes *et al.*, 2012).

Resumidamente, a infeção e a interação fungo/hospedeiro, começa com a aderência e germinação dos conídios nas superfícies dos frutos, formação e diferenciação dos apressórios com estruturas especializadas de penetração para transpor a cutícula e crescimento e colonização das hifas com produção de micélio nos tecidos dos frutos (Prusky *et al.*, 2000; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004; Diéguez-Uribeondo *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2009).

Dependendo da espécie e do hospedeiro, o género *Colletotrichum* tem vários tipos de estratégias de infeção: hemibiotrófica intracelular e necrotrófica intercelular, subcuticular intramural, ou a combinação das duas (Bailey *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 2000). Nas infeções hemibiotróficas, há uma fase biotrófica (assintomática) seguida por uma fase necrotrófica (destrutiva) durante a qual os sintomas se tornam visíveis (Bailey *et al.*, 1992).

O grau de hemibiotrofia varia com as diferentes espécies de *Colletotrichum* e a interação fungo/hospedeiro vai-se modificando ao longo do ciclo de vida, passando da fase biotrófica à fase necrotrófica, em função das condições ambientais, da maturação fisiológica e da suscetibilidade do hospedeiro e da virulência do agente patogénico (Stergiopoulos & de Wit, 2009; Newton *et al.* 2010; Delaye *et al.*, 2013; Stergiopoulos & Gordon, 2014).

2.2.1. Condições ambientais

A severidade e a evolução da gafa estão profundamente relacionadas com condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do seu agente causal. O ciclo de vida dos fungos é altamente dependente de precipitação ou humidade relativa do ar elevada, uma vez que interferem diretamente na disseminação dos esporos e no processo infeccioso.

Em Portugal, os sintomas de gafa surgem principalmente no outono, estação do ano caracterizada por ocorrência de precipitação, humidade relativa elevada e temperaturas amenas, condições meteorológicas descritas como ideais para potenciar a incidência e a severidade da doença (Talhinhas *et al.*, 2005; Salotti & Rossi, 2022).

Os sintomas de infeção caracterizam-se por lesões visíveis na superfície dos tecidos do hospedeiro, que são formadas por manchas circulares enegrecidas, geralmente em depressão, com produção abundante de massa mucilaginosa alaranjada, impregnada de conídios (Cacciola *et al.* 2012; Materatski *et al.*, 2018). À medida que a infeção evolui, os

sintomas agravam-se, as manchas confluem umas nas outras, causando podridão em todo fruto. Os frutos infetados caem prematuramente ao chão ou perdem massa por desidratação, acabando por mumificar. Alguns destes permanecem na árvore até ao outono seguinte, funcionando como fonte de inóculo (Moral & Trapero, 2012).

As infeções podem acontecer em qualquer parte do fruto, mas são mais frequentes no ápice onde a água da chuva ou do orvalho permanece por mais tempo. A infeção do hospedeiro requer a presença de água ou humidade relativa superior a 90% e temperaturas entre 10 e 30°C. Nestas condições, os conídios apresentam alto poder germinativo durante os primeiros 15 dias, perdendo progressivamente esse poder nos 15 dias seguintes (Trapero & Blanco, 2004). O período de incubação, em condições ambientais ótimas, é de 4 a 6 dias (Trapero & Blanco, 2004).

A temperatura ótima para cada fase do ciclo de infeção varia para cada espécie, e nessas condições o fungo alcança maiores taxas de germinação, esporulação, crescimento e infeção em menores intervalos de tempo (Tabela 1), porém, é durante o período de chuva que a gafa atinge a sua maior severidade, disseminando-se rapidamente intra e inter plantas (Freire *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Temperaturas ótimas de germinação, esporulação, crescimento e infeção de várias espécies de fungos do género *Colletotrichum* spp.

Espécies do género <i>Colletotrichum</i>	Temperatura de Germinação (°C)	Temperatura de Esporulação (°C)	Temperatura de Crescimento (°C)	Temperatura de Infeção (°C)
<i>C. nymphaeae</i>	10 - 30	25 - 30	10 - 35	21 - 25
<i>C. godetiae</i>	10 - 30	25 - 30	20 - 30	21 - 25
<i>C. gloeosporioides</i>	10 - 32	25 - 30	10 - 35	10 - 35
<i>C. acutatum</i>	6 - 36	18 - 24	10 - 35	10 - 35

Fonte: Retirado de Moral *et al.* (2012) e Salotti & Rossi (2022).

Em condições ambientais desfavoráveis, como baixa humidade, temperaturas extremas e grande incidência de raios ultravioleta, a viabilidade dos conídios é assegurada pela matriz mucilaginosa onde se encontram inseridos, rica em biotina, que inibe a germinação prematura dos esporos e os protege dos efeitos tóxicos de metabolitos secundários produzidos pela planta hospedeira (Freire *et al.* 2002; Veloso *et al.*, 2021).

Outro aspeto que favorece o desenvolvimento da doença, ainda que de maneira indireta, é a presença simultânea de *Colletotrichum* e outros fatores bióticos no olival, nomeadamente, a mosca-da-azeitona (*Bactrocera oleae*), uma praga cujo número de gerações depende também das condições ambientais (Malheiro *et al.*, 2015). Geralmente, as epidemias de gafa estão associadas a grandes incidências de mosca-da-azeitona, pois os orifícios provocados na cutícula dos frutos pelas picadas e pela saída das larvas da praga, representam uma porta de entrada para o *Colletotrichum*, favorecendo ou potenciando a severidade da doença (Sergeeva & Spooner-Hart, 2010). A interação fungo/praga pode alterar o comportamento de cultivares consideradas moderadamente suscetíveis à gafa, quando inoculada artificialmente, para um comportamento suscetível, quando a inoculação acontece no campo, através das feridas provocadas pela mosca-da-azeitona (Mateo-Sagasta, 1968). Adicionalmente, a própria praga pode funcionar como vetor portador de esporos, contribuindo dessa maneira para incrementar a propagação da doença (Malacrino *et al.*, 2015).

As condições ambientais, também favorecem o mutualismo entre seres vivos, que se define por uma relação ecológica, entre indivíduos de espécies diferentes, em que todos os envolvidos são beneficiados. Muitos desses microrganismos desempenham papéis cruciais na proteção das plantas contra doenças (Materatski *et al.*, 2019; Mina *et al.*, 2020).

A oliveira, no seu habitat natural, é colonizada por uma enorme e diversa comunidade microbiana, que cresce epifiticamente (na superfície de tecidos vegetais) e endofiticamente (dentro dos tecidos da planta) e coabita, simultaneamente, com agentes patogênicos, entre eles o *Colletotrichum* spp. (Materatski *et al.*, 2019; Mina *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021). Atualmente já foram identificados vários microrganismos que compõem a filosfera da oliveira, e estudados alguns dos seus comportamentos em relação ao agente causal da gafa.

É conhecido que alguns fungos inibem o crescimento de *Colletotrichum* spp., devido a mecanismos de antibiose que induzem alterações morfológicas nas hifas dos fungos patogênicos, tais como a ramificação ou agregação de hifas (Mina *et al.*, 2020).

A densidade de plantação também parece ter um papel importante na incidência e severidade da gafa. Alguns investigadores (Moral *et al.*, 2012) referem que a doença progride mais rapidamente e de maneira mais agressiva em olivais superintensivos (2000 oliveiras/ha) do que em olivais intensivos (200 a 800 oliveiras/ha), mesmo em olivais com cultivar Arbequina, classificada como moderadamente resistente. O elevado número de plantas nos olivais superintensivos dificulta o arejamento, favorecendo o aumento da temperatura e a permanência de humidade nas folhas e nos frutos, promovendo, assim, o desenvolvimento da doença.

O pH do solo também poderá condicionar o desenvolvimento do fungo nos frutos. Moral & Trapero (2009) observaram que existe uma relação entre a suscetibilidade ao fungo e o baixo teor de cálcio nas azeitonas, o que, segundo Roca *et al.* (2019), poderá explicar as severas epidemias que acontecem nos solos ácidos de Portugal e das províncias de Sevilha e Huelva em Espanha.

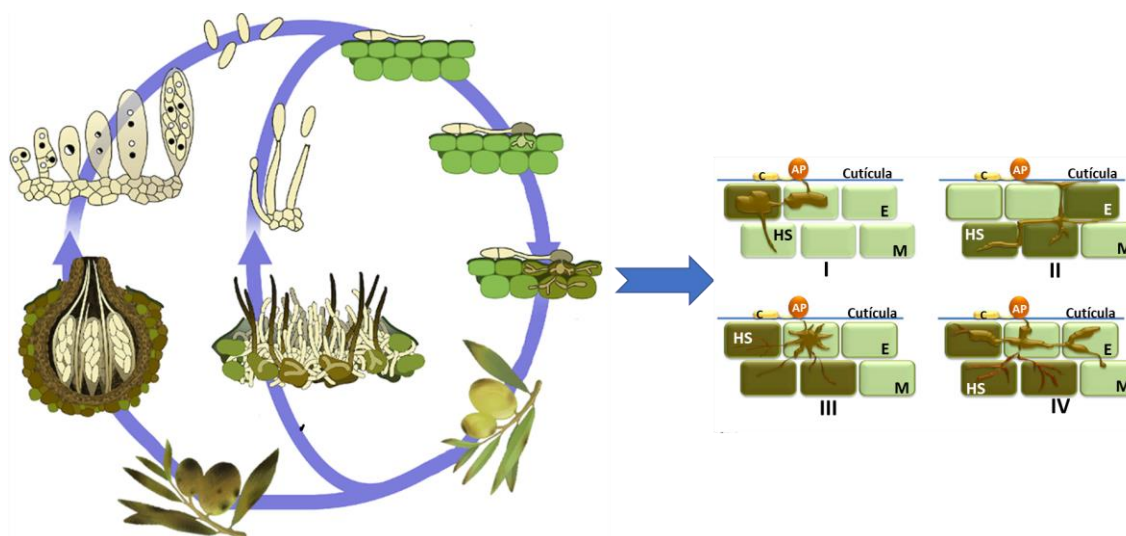
2.3.2. Maturação dos frutos

Os fungos do género *Colletotrichum*, pelas perdas económicas que causam em várias culturas em todo o mundo, têm sido muito investigados ao longo das últimas décadas. Os resultados desses trabalhos indicam que estes fungos apresentam preferência por tecidos de frutos maduros, mas que, na sua ausência, conseguem sobreviver sobre as folhas e ramos na forma de conídios latentes (Talhinhas *et al.*, 2011).

O ciclo de vida do fungo (Figura 2) começa na primavera/verão com as primeiras infeções, desde que as condições ambientais sejam favoráveis para que os conídios latentes se desenvolvam. As flores e as pequenas drupas podem ficar infetadas assintomaticamente, logo na fase inicial da floração até ao crescimento dos frutos (Montri *et al.*, 2009; Mongkolporn *et al.*, 2010; Auyong *et al.*, 2012). O processo de infeção tem início com a germinação dos conídios na superfície dos frutos, seguida da diferenciação dos apressórios, que penetram nos tecidos vegetais formando hifas (Figura 2). Estas hifas vão ter diferentes características consoante o estado de maturação do fruto (De Silva *et al.*, 2017).

Nos frutos verdes, as hifas que se formam na cutícula, geralmente, não prosseguem o seu crescimento, ficando em estado quiescente ou latente até entrarem em maturação. No

outono/inverno já com os frutos em maturação mais avançada, o fungo diferencia hifas primárias, seguindo-se uma colonização intensa de hifas primárias e secundárias que se ramificam, necrosando as células do fruto (Figura 2) dando origem aos primeiros sintomas da doença (Talhinhas *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2018). Nos frutos doentes, formam-se acérvulos com um elevado número de conídios, que irão originar novas infeções (Talhinhas *et al.*, 2011; Talhinhas *et al.*, 2018).



Legenda: I- Intracelular hemibiotrófica; II- Subcuticular intramural necrotrófica; III- Infeção hemibiotrófica localizada com hifas primárias lobuladas; IV- Infeção hemibiotrófica generalizada com hifas primárias e secundárias.
C- conídio; AP- apressório; E- células epidérmicas; M- Células mesófilas; HS- hifas secundárias.

Figura 2 - Ciclo de vida e processo de infecção do fungo do género *Colletotrichum* spp.
Fonte: Retirado e adaptado de De Silva *et al.* (2017).

As infeções secundárias dos frutos adjacentes ocorrem com a dispersão dos conídios através do vento e dos salpicos das gotas da chuva (King *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 2007). A manutenção de condições ambientais favoráveis durante o outono favorece a ocorrência de vários ciclos de infeções secundárias, dando origem a epidemias.

A penetração do fungo nos tecidos vegetais é sempre um acontecimento crucial na interação agente patogénico/planta e o sucesso da colonização depende da capacidade que o microrganismo tem para se alimentar dos nutrientes do hospedeiro.

Na azeitona, o estado de maturação pode comprometer o sucesso de colonização do fungo (Moral *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Os frutos verdes são fisiologicamente menos suscetíveis a infeções (Moral *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2009). No entanto, o fungo consegue sobreviver neles em estado latente, deixando-os assintomáticos. Se a cultivar for suscetível ao *Colletotrichum*, em condições ambientais favoráveis os frutos podem manifestar sintomas, ainda que se encontrem no estado inicial de maturação (Moral *et al.*, 2008; Moral & Trapero, 2012).

A resistência dos frutos verdes a infeções por espécies *Colletotrichum* pode estar relacionada com os baixos teores de açúcares nessa fase de maturação, tornando-os em substratos inadequados para satisfazer as necessidades nutricionais e energéticas do agente patogénico (Wharton & Diéguez-Urbeondo, 2004). Além disso, os frutos imaturos

contêm elevados teores de metabolitos secundários tais como alcaloides, taninos, fenóis e resinas, que, devido à sua atividade antimicrobiana, criam um ambiente hostil e tóxico para o desenvolvimento deste agente patogénico (Dixon, 2001).

Contrariamente, a relação linear positiva entre a suscetibilidade ao fungo e o aumento da maturação dos frutos (Gomes *et al.*, 2009) deve-se, possivelmente, à grande quantidade de nutrientes, ao seu pH (\approx 4-4,5) e à diminuição da resistência intrínseca dos frutos maduros (Miles *et al.*, 2012), que os transforma num ótimo substrato para o desenvolvimento e crescimento deste microrganismo.

Embora ainda não se conheçam verdadeiramente os motivos que levam o agente causal da gafa a preferir azeitonas maduras, sabe-se que durante o amadurecimento dos frutos ocorrem alterações fisiológicas significativas, tais como a ativação da biossíntese de hormonas, mudanças na cutícula, distensão das paredes celulares, alterações na textura e na firmeza, aumento de açúcares solúveis, diminuição de compostos fenólicos preformados e também alterações das condições de pH, que poderão estimular e promover a passagem do fungo do seu estado quiescente para um comportamento patogénico (Miles *et al.*, 2012). A composição dos frutos pode desempenhar um papel na resistência, afetando diretamente o crescimento fúngico ou indiretamente através da modulação da atividade enzimática do hospedeiro (Miles *et al.*, 2012). Segundo Guestsky *et al.* (2007), a maior suscetibilidade dos frutos na fase mais avançada de maturação pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de flavonoides.

As mudanças fisiológicas que acontecem na cutícula e na estrutura das paredes celulares dos frutos durante a fase de maturação parecem contribuir para que os frutos maduros sejam os principais alvos dos fungos *Colletotrichum* (Mafrá *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012). Neste contexto, também é referido que a maior suscetibilidade dos frutos maduros às infeções do *Colletotrichum*, está relacionada com a perda de mecanismos de resposta para atrasar a infeção, que possuíam enquanto frutos imaturos (Miles *et al.*, 2008; Gouvinhas *et al.*, 2019). Embora, esses mecanismos não tenham sido, ainda, muito estudados na antracnose da azeitona, alguns estudos sugerem que a maior concentração de compostos fenólicos verificada nos frutos em início de maturação poderá ser responsável pela sua maior resistência à doença (Gouvinhas *et al.*, 2019).

2.3.3. Suscetibilidade da cultivar

As plantas estão continuamente expostas a condições de stresse biótico e abiótico, pelo que, para garantirem a sua sobrevivência, desenvolveram mecanismos de adaptação e de defesa, que lhes permitem ultrapassar as adversidades ambientais e os ataques de pragas e doenças. A eficácia desses mecanismos está intimamente relacionada com as características genéticas da planta e com a virulência do agente patogénico.

Segundo Freeman & Beattie (2008), os mecanismos de defesa das plantas são de dois tipos:

i) 'mecanismos constitutivos', constituídos por barreiras físicas e químicas que impedem ou atrasam a penetração do agente patogénico nos tecidos vegetais e que envolvem características estruturais dos órgãos da planta, nomeadamente, cutícula e epiderme do fruto, tricomas, presença de compostos lipídicos e fenólicos, entre outras

barreiras que funcionam como a primeira linha de defesa das plantas contra os agentes patogénicos (Gomes *et al.*, 2012).

ii) ‘mecanismos induzidos’, ativados apenas quando ocorre um sinal, desencadeado pela presença do agente patogénico nos tecidos da planta (Montesano *et al.*, 2003; Parker, 2009; Zipfel, 2008). Estes últimos são mecanismos sofisticados e pouco conhecidos, que envolvem processos bioquímicos, de transdução e de expressão génica, entre outros, e que podem envolver produção e acumulação de fitoalexinas e de proteínas-PR, bem como a formação de radicais livres, oriundos principalmente do stresse oxidativo. O objetivo final da atuação destes diferentes mecanismos é evitar ou atrasar a entrada do agente patogénico no interior da planta e criar condições adversas que impeçam a sua colonização dos tecidos vegetais (Pascholati & Leite, 1995). A maior ou menor capacidade que a planta apresenta para atrasar a doença causada pelo fungo define a sua resistência ou a sua suscetibilidade.

Em Portugal relativamente à suscetibilidade, as cultivares de azeitona ‘Galega Vulgar’ e ‘Cobrançosa’ têm sido as mais estudadas, porque, para além de terem uma grande importância na economia nacional, são utilizadas na investigação como padrões de cultivar suscetível e moderadamente suscetível, respetivamente (Gomes *et al.*, 2012).

Apesar das cultivares portuguesas terem sido pouco estudadas comparativamente às dos outros países produtores de azeitonas, existem vinte cultivares nos olivais portugueses classificadas segundo a sua suscetibilidade à antracnose da azeitona (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação de cultivares portuguesas segundo a sua suscetibilidade à gafa.

Cultivar portuguesa	Classificação	Cultivar portuguesa	Classificação
Arbequina	S, M	Cornicabra Parda	R
Azeiteira	R	Galega Grada de Serpa	S
Azeitoneira	M	Galega Vulgar	S
Bical Castelo Branco	M	Verdeal Alentejana	M, R
Blanqueta de Elvas	R	Manzanilha	S
Carrasquenha	R	Negrinha	M, R
Cobrançosa	S, M	Negral	M
Conserva de Elvas	S, M	Cornicabra	S
Cordovil de Castelo Branco	S, M	Redondal	S
Cordovil de Serpa	M	Redondil	S

Legenda: R- Resistente; S- Suscetível; M- Moderadamente suscetível.
Fonte: Retirado de Moral *et al.*, (2014) e Xavier (2015).

A inoculação artificial de azeitonas sob condições ambientais controladas, tem sido utilizada por muitos investigadores para avaliar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* e a suscetibilidade de cultivares de azeitona à antracnose (Moral *et al.*, 2008; Moral & Trapero, 2009; Schena *et al.*, 2014; Talhinhos *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2021). Os resultados das inoculações artificiais quanto à suscetibilidade das drupas infetadas têm-se mostrado consistentes com os observados em ensaios de campo (Moral & Trapero, 2009). No entanto, num estudo recente notaram-se algumas diferenças em relação a resultados anteriormente publicados (Moral *et al.*, 2017). Nesse estudo, por exemplo, a cultivar ‘Cordovil de Castelo Branco’ mostrou ser mais suscetível enquanto as cultivares ‘Arbequina’ e ‘Cobrançosa’ tiveram um comportamento menos suscetível. Porém, o mesmo estudo corrobora a resistência ou suscetibilidade moderada das cultivares ‘Bical de Castelo Branco’, ‘Manzanilla’ e ‘Picual’ (Barranco *et al.*, 2000; Rallo *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2015;

Talhinhas *et al.*, 2015). Estas contradições poderão estar associadas a erros de identificação das cultivares, ao efeito do índice de maturação no momento do estudo, à baixa pressão de inóculo, a condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento da doença ou, eventualmente, à incorreta identificação da doença, podendo ter sido confundida com outra que cause sintomas semelhantes (provocadas por exemplo por *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*...) (Moral *et al.*, 2021). Além disso, o papel da interação fungo/cultivar não pode ser ignorado uma vez que algumas espécies do género *Colletotrichum* tendem a ser, simultaneamente, pouco e muito virulentas relativamente a várias cultivares de oliveira (Xaviér, 2009; Schena *et al.*, 2014; Talhinhas *et al.*, 2015). Estes dados indicam que cultivares consideradas resistentes numa determinada zona geográfica, onde uma espécie do género *Colletotrichum* é fracamente patogénica, pode comportar-se como suscetível noutras zonas, onde outra espécie do mesmo género mais agressiva é dominante (Moral *et al.*, 2008).

2.3.4. Características do fruto como barreira física

A imunidade da planta a um agente patogénico baseia-se numa série de mecanismos de defesa, que inclui, num primeiro nível, barreiras físicas como a cutícula, a parede celular, os estomas, os tricomas e outras partes anatómicas da planta (Bhadauria *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012).

A epiderme é um tecido especializado de revestimento superficial com um papel crucial na sobrevivência de qualquer ser vivo, pois é o primeiro órgão exposto aos fatores bióticos e abióticos do ambiente exterior. Nas plantas, o tecido epidérmico é revestido pela cutícula, composta por cutina, suberina e ceras, materiais hidrofóbicos de natureza lipídica, cuja principal função é evitar as perdas de água da planta para o exterior (Diarte *et al.*, 2019). Além dessa função, a cutícula atua como uma barreira mecânica contra a entrada de agentes patogénicos pela ação de dois polímeros seus constituintes, a cutina e a suberina ligados a ceras, que, pela sua complexidade, são difíceis de degradar por microrganismos e que, dependendo da espessura ou da densidade dessa camada cuticular, podem tornar as plantas mais ou menos resistentes às infeções causadas por agentes patogénicos (Guest & Brown, 1997; Diarte *et al.*, 2023).

Os resultados dum estudo de interação fungo/cultivar onde foi analisada a espessura da cutícula dos frutos de três cultivares, classificadas quanto à patogenicidade de *Colletotrichum acutatum* como suscetíveis ('Galega'), moderadamente suscetíveis ('Cobrançosa') e resistentes ('Picual'), confirmaram que os valores mais baixos de espessura de cutícula foram observados em frutos sensíveis ('Galega') e que os mais elevados foram observados em frutos resistentes ('Picual'), sendo que os valores de espessura intermédios verificaram-se em azeitonas "Cobrançosa" de suscetibilidade moderada (Gomes *et al.*, 2009). A cutícula mais espessa, o perímetro maior e a área mais alargada das células epidérmicas dos frutos resistentes podem constituir um obstáculo mecânico à entrada do fungo, enquanto as células epidérmicas mais finas dos frutos sensíveis podem conferir-lhe menor proteção (Gomes *et al.*, 2009).

À semelhança daquele estudo também já tinha sido observado que maçãs com cutícula mais espessa eram mais resistentes a *Venturia inaequalis* (Pascholati & Leite, 1995) e que a

cutícula mais densa e espessa de espécies de tomate geneticamente modificado os tornou mais resistentes a *Botrytis cinerea* (Reina-Pinto & Yephremov, 2009).

A espessura da cutícula está diretamente relacionada com o processo de maturação dos frutos (Diarte *et al.*, 2023). Durante essa fase, ocorrem modificações naturais nas células tornando as paredes celulares dos frutos mais suscetível à ação de *C. acutatum* (Guidarelli *et al.*, 2011). Quando foram analisadas as espessuras cuticulares de frutos com diferentes graus de maturação, verificou-se que ocorre uma diminuição significativa da espessura e do grau de cutinização nos frutos maduros (Gomes *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que a espessura da cutícula poderá contribuir para o aumento de suscetibilidade dos frutos maduros a *C. acutatum* e que as diferenças relacionadas com as características da cutícula poderiam explicar porque é que algumas cultivares de azeitonas são mais severamente atacadas por *C. acutatum* do que outras (Gomes *et al.*, 2009).

Um estudo em azeitonas com três fases de maturação (verde, pintor e madura) indicou que os constituintes das paredes celulares, pectina, polissacáridos celulósicos e hemicelulósicos se degradam e/ou se solubilizam com o avançar da maturação dos frutos, tendo-se notado um enfraquecimento dessas estruturas celulares (Diarte *et al.*, 2019). Estes dados podem explicar que as perdas de textura e de firmeza das paredes celulares da cutícula e da polpa dos frutos maduros, os tornem mais vulneráveis à penetração do fungo e à ação das enzimas poligalacturonases que ele produz para penetrar nos tecidos do fruto (Guidarelli *et al.*, 2011).

A natureza lipídica da cutícula também pode ter um papel relevante na penetração dos agentes patogénicos no interior dos tecidos. A elevada quantidade de ceras na cutícula torna mais escorregadias as superfícies onde os agentes patogénicos são normalmente depositados, dificultando a adesão dos esporos (Podila *et al.*, 1993) e impedindo a retenção de água sobre os órgãos da planta, essencial para a germinação dos conídios (Marcell & Beattie 2002).

Quando o agente patogénico consegue ultrapassar as primeiras barreiras físicas de defesa da planta, existem outros compostos na cutícula responsáveis por sinalizar a presença do agressor, que induzem a ativação de outros mecanismos (Reina-Pinto & Yephremov, 2009).

Além da cutícula, também as paredes celulares desempenham um papel ativo na defesa contra fungos patogénicos (Guest & Brown, 1997; Glazebrook, 2005; Wan *et al.*, 2021), recebendo e processando a informação da superfície do agente patogénico e transmitindo essa informação à membrana plasmática da célula vegetal (Guest & Brown, 1997). Através de processos de ativação génica, a célula vegetal defende-se, criando barreiras à invasão, nomeadamente, através da produção de fitoalexinas e outros metabolitos secundários antifúngicos tóxicos, nomeadamente compostos fenólicos, e/ou através da síntese e deposição de substâncias no local infetado, como a lenhina, que atua isolando o fungo da planta, impedindo-o de ter acesso aos seus nutrientes (Gomes *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2021). Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos encontrados na parede celular, particularmente ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, que atuam como reservatórios de unidades fenilpropanoides para a biossíntese de lenhina (Guest & Brown, 1997).

2.3.5. Compostos fenólicos como barreiras químicas

Os mecanismos de defesa que as plantas acionam para se defenderem das pressões bióticas e abióticas a que estão sujeitas alteram a sua fisiologia e os seus processos metabólicos normais (Kumar & Verma, 2018). De todos os processos envolvidos nos mecanismos de defesa, os bioquímicos, desempenham um papel vital na proteção das plantas contra agentes patogénicos (Roy *et al.*, 2018).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários sintetizados pelas plantas que intervêm nesses processos bioquímicos. Este tipo de compostos apresenta uma grande diversidade estrutural e funcional (Hagerman & Butler, 1991), onde nem todos têm função conhecida, sendo que alguns deles parecem ser simples intermediários do metabolismo normal das plantas (fenóis pré-formados) (Beckman, 2000), enquanto outros são sintetizados como resposta a situações de stresse (fenóis induzidos) (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Os fenóis são produzidos em células especializadas e armazenados, na sua forma reduzida, não tóxica, em locais estratégicos normalmente, nos vacúolos do citoplasma, localizados na epiderme. Quando a planta é sujeita a algum tipo de stresse a concentração destes compostos tende a aumentar como resposta defensiva e passam para a sua forma não reduzida e tóxica (Hrazdina & Wagner, 1985), isto é, são convertidos em antibióticos biologicamente ativos através de processos de hidrólise por glicosidases. Neste tipo de resposta, os fenóis livres são muito mais tóxicos para o organismo invasor do que as formas ligadas (Guest & Brawn, 1997).

Alguns autores apontam a eficácia antimicrobiana de certas classes fenólicas, como: os flavonoides, as cumarinas e os derivados dos ácidos hidroxibenzóico, cumárico e cafeico. Estes compostos inibem a germinação de esporos e o crescimento do micélio fúngico e inativam enzimas específicas produzidas pelo agente patogénico (Báidez *et al.*, 2006).

Identicamente, noutro trabalho de investigação, os compostos fenólicos de *Olea europaea*, tirosol, catequina e oleuropeína, mostraram atividade antifúngica sobre *Phytophthora* sp. (Del Rio *et al.*, 2003), enquanto a quercetina 3-metil éter e os seus 4-*O*-glucósido e 7-*O*-glucósido, inibiram completamente a germinação conidial do fungo *Neurospora crassa* (Parvez *et al.*, 2004). Estas evidências sugerem que os compostos fenólicos pré-formados ou estruturais (fenóis livres ou os seus produtos de oxidação, as quinonas) possam ser a primeira linha de defesa das plantas, seja como produtos tóxicos ou como barreira química no tecido invadido (Wittstock, & Gershenzon, 2002).

No mecanismo de defesa induzido, são os compostos fenólicos não estruturais que intervêm e são sintetizados após ativação dum conjunto de sinais génicos desencadeados pela presença do agente patogénico nos tecidos da planta. Este tipo de mecanismo inclui proteínas e enzimas responsáveis pela síntese de compostos fenólicos, como flavonoides, lenhinas, fitoalexinas, entre outros (De Bona *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013).

Foi confirmado que nas fases iniciais de maturação, os níveis de compostos fenólicos é superior aos dos frutos maduros e que nos frutos verdes a atividade de compostos fenilpropanoides e flavonoides interromperam o desenvolvimento fúngico (Ardi *et al.*, 1998; Guidarelli *et al.*, 2011). De forma semelhante vários flavonoides mostraram desempenhar um papel fundamental na supressão do crescimento e desenvolvimento de *Colletotrichum acutatum* em frutos de mirtilo (Miles *et al.*, 2008).

Gouvinhas *et al.* (2016) ao medirem a concentração de vários compostos fenólicos em azeitonas 'Galega' e 'Picual' consideradas suscetível e resistente respetivamente, infetadas por *Colletotrichum acutatum*, observaram que na cultivar resistente a concentração fenólica era bastante superior à da cultivar suscetível. Mas apesar dos baixos teores fenólicos existentes nas amostras suscetível 'Galega', após infeção apresentaram uma resposta imediata ao ataque fúngico, traduzindo-se num aumento dos teores daqueles compostos (Gouvinhas *et al.*, 2016). Confirmando estes dados, Lattanzio *et al.* (2006), por seu turno, referem que estes compostos aumentam nos tecidos das plantas em situações de stresse e que participam ativamente nos mecanismos de defesa das plantas.

3. Gafa e a qualidade do azeite

No setor do azeite, o conceito de qualidade tem evoluído muito ao longo dos tempos. Atualmente, podemos considerar que esse conceito abrange a qualidade comercial, a qualidade nutricional e os benefícios para a saúde que o azeite pode oferecer ao consumidor.

A legislação referente às normas de comercialização de azeite em Portugal é a vigente na União Europeia. Esta obriga à classificação do azeite em categorias, de acordo com a qualidade avaliada segundo critérios físico-químicos e organoléticos.

A qualidade comercial é definida pela Comunidade Europeia através do Regulamento CEE 2568/91, atualizado pelo Regulamento (UE) 2019/1604 e compreende um exame organolético e vários parâmetros químicos como a acidez livre, o índice de peróxido, os coeficientes de extinção específicos na região UV (K_{270} , K_{232} e ΔK) e, desde 2011, mas apenas para azeites de categoria virgem extra, os teores de ésteres etílicos dos ácidos gordos, estabelecidos como normas de qualidade para cada categoria de azeite. Essas normas determinam que o azeite se classifique como “virgem extra”, “virgem” ou “lampante”, por ordem decrescente de qualidade. Um azeite “lampante” é, inclusive, não apto para consumo humano e só pode ser comercializado a granel com destino à indústria de refinação.

A qualidade nutricional e os efeitos benéficos para a saúde são reconhecidos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2011) através de alegações nutricionais e de saúde, igualmente regulamentadas pela Comissão Europeia (Regulamento (EU) 432/2012). Alguns dos componentes do azeite contemplados por alegações são os ácidos gordos monoinsaturados, os tocoferóis (Vitamina E) e os compostos fenólicos (polifenóis).

Produzir azeites virgens de elevada qualidade química, sensorial e nutricional só é possível a partir de azeitonas sãs. Mas manter a sanidade e a integridade dos frutos em anos favoráveis ao aparecimento de pragas e doenças no olival é uma tarefa muito difícil para o olivicultor.

Como já foi referido, uma das doenças mais difíceis de combater e mais comum em Portugal e na Bacia do Mediterrâneo é a gafa ou antracnose da oliveira, que provoca a queda prematura dos frutos e reduz a qualidade do azeite (Cacciola *et al.*, 2012), refletindo-se em graves prejuízos económicos.

A comunidade científica tem vindo a realizar vários estudos com o intuito de desvendar e entender a interação da doença sobre os compostos da azeitona e os seus efeitos na qualidade do azeite (Tabela 3).

Tabela 3 - Referências bibliográficas e resultados relativos aos efeitos de *Colletotrichum* spp. inoculado artificialmente em azeitonas sobre alguns compostos químicos do azeite.

Referência	Parâmetros e resultados	Cultivar
Iannotta <i>et al.</i> (1997)	Azeite com mais de 30% de infecções: Acidez (++) > 0,8% IP (++) >20 meq O ₂ /kg	'Sinopolese'
Carvalho <i>et al.</i> (2008)	Acidez (+); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Fenóis totais (-) Ácidos gordos (=) Estabilidade oxidativa (-)	'Galega Vulgar'
Sousa <i>et al.</i> (2005)	Acidez l (++); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Ácidos gordos monoinsaturados (-) Ácidos gordos saturados (+)	'Galega Vulgar', 'Cordovil de Castelo Branco' 'Cobrançosa', 'Madural' e 'Verdeal Transmontana'
Runcio <i>et al.</i> (2008)	Formação de aldeídos voláteis associados a defeitos: heptanal, octanal e nonanal (+)	'Leccino', 'Pendolino', 'Ciciarello', 'Nocellara', 'Coratina', 'Carolea' e 'Ottobratica'
Conde <i>et al.</i> (2013a)	Acidez l(+); IP (+);K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) 'Frantoio' 3 e 5 % infecção, acidez > 0,8% 'Arbequina' 5 e 7,5% infecção; acidez > 0,8% A. sensorial (-) 'Frantoio' A. sensorial 3% (defeitos) 'Arbequina' A. sensorial 1,5% (defeitos)	'Arbequina' e 'Frantoio'
Torbati <i>et al.</i> (2014)	Acidez (+) IP (+)	'Zard' e 'Roghani'
Da Silva (2016)	Acidez (+); IP (+) K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Avaliação sensorial (-) Ácidos gordos: C22:1 (+) C24:0 (+) Tocoferóis totais (-) α-tocoferol (-) Esteróis totais (+) Hidroxitirosol (-) Tirosol (-) Estabilidade oxidativa (-) Cor (laranja)	'Madural'
Leoni <i>et al.</i> (2018)	Acidez (+) com 13% de incidência na cv. 'Arbequina' e de 50% na cv. 'Frantoio' e severidade 1,5 e 2, > 0,8% IP (=); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (=) Fenóis totais (-)	'Arbequina' e 'Frantoio'
Peres <i>et al.</i> (2021)	Acidez (++) >0,8 ('Gal' '5% 'Cob' 2%); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Avaliação organoléptica (-) Defeito mofo nas 2 cvs mas mais cedo na 'Galega' vulgar Ésteres etílicos (+) Fenóis totais (-) Ácidos gordos: linoleico (+) Ceras (+)	'Galega Vulgar' e 'Cobrançosa'
Kishimoto (2018)	12 compostos voláteis (+) defeitos Acidez (+); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Vitaminas A e E (-)	'Mission' e 'Lucca'
Markakis <i>et al.</i> (2021)	Acidez (++); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Fenóis totais (-)	
Romero <i>et al.</i> (2022)	Acidez (+); IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+)	'Arbequina', 'Hojiblanca' e 'Picua'l
Abacıgil <i>et al.</i> (2023)	Acidez (+) até 5,42% IP (+); K ₂₃₂ e K ₂₇₀ (+) Fenóis totais (-) o-difenóis (-) α-tocoferol (-) atividade antioxidante (-) Ácidos gordos: Palmítico (+); linoleico (+); estearico (+)	'Ayvalik'

Legenda: (++) Aumentou significativamente; (+) Aumentou; (=) Sem alteração; (-) Baixou; (--) Baixou significativamente.

3.1. Efeitos da gafa nos critérios de qualidade do azeite

As reações de degradação do azeite provocam alterações a nível da sua composição química e nas suas características sensoriais. A lipólise e a oxidação são algumas das reações químicas envolvidas na degradação do azeite (Peri, 2014).

A acidez do azeite forma-se durante a degradação da estrutura celular da azeitona. As gotas de gordura contidas no vacúolo dão origem a ácidos gordos livres, quando entram em contacto com as enzimas celulares, como é o caso das lipases, que atuam na rutura das ligações dos ácidos gordos (Boskou *et al.*, 2006; Peri, 2014). Fatores como pragas e doenças a que as azeitonas estão sujeitas, a manipulação e o tempo de armazenamento dos frutos, assim como o processo de extração, afetam a acidez do azeite (Peri, 2014). Este parâmetro está, pois, diretamente relacionado com a qualidade dos frutos.

Prusky *et al.* (2001) referem que a secreção de amoníaco pelo fungo aumenta o pH dos tecidos do hospedeiro. Verifica-se uma relação direta entre a percentagem de acidez e as secreções amoniacais na infeção do fungo (Prusky *et al.*, 2001; Alkan *et al.*, 2008), pelo que, a avaliação do pH nos frutos poderá ser uma possibilidade de identificação do ataque.

Por outro lado, o processo de oxidação consiste na interação entre ácidos gordos principalmente insaturados e espécies reativas de oxigénio. Este processo é favorecido sobretudo pela ação do oxigénio, da temperatura, da presença de luz e de catalisadores metálicos (Boskou *et al.*, 2006). Após o início, de um processo de oxidação, formam-se os primeiros compostos - os peróxidos e hidroperóxidos - designados por produtos de oxidação primária. Estes compostos decompõem-se formando moléculas mais pequenas e dando origem a compostos de oxidação secundária tais como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas, entre outros (Wang *et al.*, 2016), com capacidade de absorver a luz, na região ultravioleta do espectro. Os valores de absorvância a 232 nm e a determinação do índice de peróxidos são considerados como uma medida para a oxidação primária. Por outro lado, os valores de absorvância a 270 nm medem a oxidação secundária (Boskou *et al.*, 2006), enquanto o parâmetro " ΔK " pode ser um indicador de uma eventual mistura de azeite virgem e azeite refinado e é calculado a partir da absorvância a 270 nm na faixa dos 264 - 276 nm (Houshia *et al.*, 2019).

Por sua vez, o exame organolético visa a deteção de defeitos sensoriais no azeite, resultantes de azeitonas degradadas por pragas/doenças ou por armazenamento prolongado e/ou eventuais falhas no processo de obtenção do azeite. A avaliação sensorial desempenha um papel central na caracterização e classificação do azeite. O método regulamentado para a avaliação organolética baseia-se na medição da intensidade de defeitos e de características positivas (atributos) percebidas por um painel de provadores devidamente selecionado e treinado segundo determinadas normas. As principais características positivas avaliadas são o frutado, o amargo e o picante, enquanto os defeitos mais comuns detetados são, entre outros, madeira, tulha/borra, avinhado/avinagrado mofo e ranço.

Os atributos sensoriais do azeite devem-se à forte estimulação dos recetores sensoriais humanos por compostos voláteis e não voláteis (fenóis) que são responsáveis pelas sensações olfativas e gustativas, respetivamente (Peri, 2014).

Os compostos C6 e C5 presentes no azeite, em especial os aldeídos lineares insaturados e saturados de C6 como hexanais, cis/trans-hexenal, hexanol, hexenol, ésteres de acetato,

pentenal, pentenol, são componentes voláteis do azeite virgem, responsáveis por características olfativas positivas (Angerosa *et al.*, 2004), que dependem essencialmente dos fatores genéticos e da maturação das azeitonas. Os atributos negativos, pelo contrário, são formados ainda na azeitona ou nas pastas por vias bem diferentes que envolvem processos tais como: fermentação de açúcar (avinhado), conversão de aminoácidos (leucina, isoleucina e valina) (tulha), atividades enzimáticas de fungos (mofo, bolor), microrganismos anaeróbios (borra) e processos de oxidação (ranço) (Procida *et al.*, 2016).

Como já foi referido, os sintomas típicos da antracnose são o apodrecimento e a desidratação das azeitonas. Por isso, mais do que os parâmetros químicos, um dos critérios de qualidade mais sensível aos efeitos da gafa no azeite é a análise sensorial (Conde *et al.*, 2013a; Da Silva, 2016; Peres *et al.*, 2021).

Nos vários trabalhos de investigação onde foi realizado o exame organolético a azeites obtidos de azeitonas infetadas por *Colletotrichum*, foram-lhes detetadas notas sensoriais negativas (Conde *et al.*, 2013a; Da Silva, 2016; Peres *et al.*, 2021).

Em conformidade com os dados anteriores, noutra investigação foram identificados vários compostos voláteis associados a defeitos sensoriais como os aldeídos heptanal, octanal e nonanal, em azeites obtidos de azeitonas infetadas por gafa (Runcio *et al.*, 2008). Ainda a esse respeito, Kishimoto (2018) identificou doze compostos voláteis altamente específicos em azeites de frutos infetados por antracnose, quase todos associados a odores defeituosos como avinhado, avinagrado, álcool, sebo ou banha.

Vários estudos realizados em azeites obtidos de azeitonas infetadas por *Colletotrichum* spp. reportaram alterações químicas consideráveis que determinaram, na maioria dos casos, que os azeites ficassem fora das categorias 'virgem extra' ou 'virgem' e passassem a azeite 'lampante'. Apesar dos resultados mostrarem aumentos nos compostos de oxidação primária, a acidez livre foi sempre o parâmetro mais afetado, especialmente, em azeites de cultivares consideradas sensíveis à antracnose (Iannotta *et al.*, 1997; Peres *et al.*, 2021).

Assim, alguns autores referem como limiares indicativos que, dependendo da cultivar, quando a incidência de antracnose excede 4–20 % e 40–45 %, o azeite pode perder a qualificação de azeite virgem extra ou virgem, respetivamente, porque, a partir destes limiares de infeção, os azeites apresentam valores de acidez livre superiores aos limites legais para aquelas categorias (Iannotta *et al.*, 1997; Leoni *et al.*, 2018).

Os ésteres etílicos e metílicos de ácidos gordos resultam da esterificação de ácidos gordos livres com etanol e metanol, respetivamente. A avaliação destes compostos foi introduzida em 2011 como um parâmetro de qualidade para a categoria de azeite virgem extra (Regulamento (EU) 61/2011). São compostos não voláteis que podem ser bons indicadores da qualidade das azeitonas e do seu azeite, uma vez que o metanol e o etanol são formados durante a fermentação da azeitona, originando defeitos sensoriais do azeite (Peres *et al.*, 2021).

Peres *et al.* (2021) estudaram os efeitos da gafa sobre estes compostos em azeites de azeitonas das cultivares 'Galega' e 'Cobrançosa' inoculadas artificialmente com três espécies de *Colletotrichum*. Os resultados revelaram um aumento dos seus valores ao longo do período de incubação, embora com maior expressão nos azeites da cultivar 'Galega', considerada mais sensível à antracnose, sobretudo quando infetada pelas duas espécies mais virulentas (*C. acutatum* e *C. nymphaeae*) usadas no estudo.

3.2. Efeito da gafa no perfil de ácidos gordos do azeite

O azeite é constituído maioritariamente por ácidos gordos. Os ácidos gordos predominantes são os monoinsaturados sendo o ácido oleico o mais abundante (55 – 83 %) (Al-Bachir & Sahloul, 2017). O perfil monoinsaturado de ácidos gordos é um dos fatores que contribui para explicar os benefícios saudáveis do azeite.

O alto valor nutricional do azeite está relacionado com a proporção relativamente alta de ácidos gordos monoinsaturados, pequena proporção de ácidos gordos saturados e uma proporção substancial de ácidos gordos essenciais (linoleico ω -6/linolénico ω -3), sendo a relação entre estes dois ácidos muito próxima da considerada ótima pelos nutricionistas (Peri, 2014).

O ácido oleico contém apenas uma ligação dupla, sendo por isso muito menos suscetível à oxidação, explicando-se assim a sua grande ação antioxidante e a sua alta estabilidade, propriedades que conferem ao azeite um elevado tempo de vida e maior resistência às elevadas temperaturas (Peri, 2014).

O efeito da gafa no perfil dos ácidos gordos de azeites obtidos de azeitonas infetadas é estudado com alguma frequência (Abacigil *et al.*, 2023; Peres *et al.*, 2021; Da Silva, 2016; Sousa *et al.*, 2005). Vários autores mencionam que o perfil dos ácidos gordos permanece praticamente estável, mesmo em casos de maiores incidências da doença (Iannotta *et al.*, 1997; Mincione *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004), enquanto outros autores referem resultados diferentes. Por exemplo, Sousa *et al.* (2005), verificaram uma diminuição dos ácidos gordos monoinsaturados. Por sua vez, os dados de Peres *et al.* (2021) traduziram um aumento nos valores do ácido linoleico ao longo do período de incubação das três espécies de *Colletotrichum* usadas no estudo, em azeitonas das cultivares ‘Galega’ e ‘Cobrançosa’, enquanto os resultados de Da Silva (2016) mostraram um ligeiro aumento dos ácidos erúcido (C22:1) e lignocérico (C24:0) em azeite obtidos de azeitonas ‘Madural’ infetadas, e, ainda, os resultados do estudo realizado por Abacigil *et al.* (2023) indicaram que a percentagem dos ácidos gordos palmítico, linoleico e esteárico aumentou em azeites obtidos de azeitonas com antracnose .

3.3. Efeitos da gafa nos compostos bioativos do azeite

Os fenóis são os compostos mais diferenciadores do azeite por lhe imprimirem características sensoriais únicas e lhe conferirem propriedades bioativas benéficas para a saúde. São considerados metabolitos secundários das plantas, sintetizados durante o crescimento do fruto e produzidos em geral como resposta ao stresse ambiental do verão (seca e radiações ultravioleta) ou como defesa da própria planta ao ataque de pragas e doenças (Visioli *et al.*, 2002; Cerretani *et al.*, 2005).

A presença de vários compostos bioativos no azeite, alguns dos quais exclusivos da família *Oleacea* (Obied *et al.*, 2008) têm despertado grande interesse nas últimas décadas pelos seus efeitos benéficos para a saúde. A bioatividade exercida por esses compostos tem sido associada às suas propriedades antioxidantes (Ramos-Escudero *et al.*, 2015).

O perfil fenólico do azeite virgem deriva principalmente da quantidade de glicósidos fenólicos originalmente encontrados na azeitona, bem como da atividade de enzimas

oxidativas e hidrolíticas específicas durante o processamento do azeite virgem, tais como as β -glucosidases (Velázquez-Palmero *et al.*, 2017).

A maioria dos compostos fenólicos identificados no azeite pertence a cinco classes diferentes: ácidos fenólicos (especialmente derivados dos ácidos benzoico e cinâmico), flavonoides (luteolina e apigenina), lignanas (pinoresinol e acetoxipinoresinol), álcoois fenólicos (hidroxitirosol e tirosol) e secoiridoides (derivados de aglicona da oleuropeína e ligstrosídeo) (Montedoro *et al.*, 2000). O grupo dos secoiridoides como formas conjugadas de hidroxitirosol e tirosol tem sido amplamente estudado, devido às suas propriedades saudáveis e representa a família fenólica de maior concentração no azeite (Bendini *et al.*, 2007). O interesse por este grupo de compostos fenólicos foi impulsionado pelo parecer científico favorável da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), que levou à aprovação da alegação de saúde "os fenóis do azeite contribuem para a proteção dos lipídios do sangue contra o stresse oxidativo", incluída no Regulamento da Comissão EU 432/2012. A alegação de saúde só pode ser incluída no rótulo quando o azeite tiver pelo menos 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (por exemplo, complexo oleuropeína e tirosol) por 20 g de azeite (EFSA, 2011).

Os compostos fenólicos também são descritos como parâmetros muito úteis para avaliar a qualidade do azeite. De todos os compostos fenólicos do azeite destacam-se, pelas propriedades organolépticas, o hidroxitirosol, o tirosol e a aglicona de oleuropeína - responsáveis pelo sabor amargo e pela adstringência e a aglicona do ligstrosídeo (oleocantal) - originando sensações de picante e ardência na garganta (Kanakis *et al.*, 2013). Além da sua contribuição para as propriedades sensoriais, estes compostos apresentam propriedades antioxidantes, conferindo resistência ao azeite à oxidação, melhorando a sua estabilidade e o seu tempo de vida.

O que se sabe da relação da gafa e estes compostos é que os polifenóis totais diminuem nos azeites obtidos a partir de azeitonas infetadas (Leoni *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2021; Da Silva, 2016). Mas o efeito da gafa sobre os fenóis individuais do azeite é praticamente desconhecido. Até ao momento, apenas se conhecem os resultados de Da Silva (2016) unicamente sobre o hidroxitirosol e o tirosol. Os resultados deste estudo revelaram que as concentrações dos dois álcoois fenólicos diminuíram drasticamente com a infeção, embora mais notória no hidroxitirosol.

A fração lipofílica dos compostos fenólicos é constituída maioritariamente por tocoferóis (Vitamina E) e também por tocotrienóis. O α -tocoferol representa cerca de 90 % dos tocoferóis do azeite e é reconhecido como a forma mais ativa de vitamina E. A restante percentagem é constituída pelos diferentes homólogos (β -, γ - e δ -tocoferol) (Gimeno *et al.*, 2002). Estes compostos além da função vitamínica têm características antioxidantes, especialmente o α -tocoferol, contribuindo para a estabilidade oxidativa do azeite, pois inibe a fotooxidação por desativação do oxigénio singleto (Boskou, 2006).

Num estudo comparativo entre um azeite obtido de azeitonas sãs e outro obtido de azeitonas infetadas com gafa houve um decréscimo nos teores de tocoferóis totais no azeite de azeitonas com a doença, tendo sido a concentração de α -tocoferol a mais afetada (Da Silva, 2016).

O β -caroteno é um pigmento que contribui para os tons amarelos do azeite, é um precursor da vitamina A (retinol), que estruturalmente é metade da molécula de β -caroteno

e tem propriedades antioxidantes, o que o torna outro composto do azeite de elevado valor biológico, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes (Minguez-Mosquera *et al.*, 2008). Este composto é sintetizado unicamente por organismos fotossintéticos, pelo que os seres humanos têm de o obter exclusivamente através da dieta (Belitz *et al.*, 2008).

Os principais carotenoides presentes no azeite são a luteína e o β -caroteno (Boskou, 2011). Desconhecem-se quaisquer estudos sobre as implicações da gafa no teor em β -caroteno de azeite extraídos de azeitonas infetadas. Apenas Kishimoto (2018) fez um estudo sobre a vitamina A. Os dados do seu estudo indicam que a presença de antracnose nas azeitonas degrada essa propriedade biológica importante do azeite.

Até ao momento, os resultados da investigação deixam bem patente que o azeite perde qualidade quando obtido de azeitonas infetadas por gafa e que a degradação é proporcional à incidência e à severidade da doença nos frutos (Da Silva, 2016; Peres *et al.*, 2021; Abacigil *et al.*, 2023).

4. Estratégias para o combate à doença

Os elevados níveis de poluição ambiental e as alterações climáticas registadas nas últimas décadas são, em parte, efeito da aplicação indiscriminada de produtos fitofármacos e de fertilizantes. Embora a toxicidade ambiental da maior parte dos produtos químicos seja hoje menor do que no passado, atualmente privilegiam-se os meios de proteção menos agressivos para os ecossistemas. A proteção integrada da gafa exige a integração racional de todos os meios e estratégias disponíveis para conseguir um combate satisfatório da doença, para obter uma azeitona de elevada qualidade com o mínimo impacto ambiental. Das medidas de luta disponíveis, destacam-se a luta cultural, a luta genética, os métodos biológicos e os métodos químicos.

4.1. Meios de luta cultural

Devido à importância da presença de água e/ou de humidade relativa elevada para o desenvolvimento da doença, as estratégias de luta contra esta doença, passam por medidas culturais que favoreçam o arejamento e reduzam a humidade das folhas, como a poda racional que evite copas densas e menores densidades de plantação (Moral *et al.*, 2008; Sergeeva, 2011; Cacciola *et al.*, 2012). É também prática aconselhável remover as fontes de inóculo, como folhas e azeitonas infetadas que tenham caído no chão ou que permaneceram na árvore, bem como eliminar os detritos resultante das podas (Conde *et al.*, 2013b).

Uma vez que a suscetibilidade à doença da gafa aumenta com o estado de maturação da azeitona, a colheita precoce é uma estratégia de controlo muito eficaz (Moral *et al.*, 2014). Neste sentido alguns autores recomendam a utilização de cultivares de maturação mais tardia uma vez que nessas cultivares, a maturação da azeitona coincide com temperaturas mais baixas e, portanto, menos favoráveis à propagação da doença (Bompeix *et al.*, 1988). Tendo em conta que, em condições de campo, as azeitonas aparentemente sãs podem apresentar infeções latentes, é recomendável antecipar a colheita quando se observam as primeiras azeitonas infetadas (Roca *et al.*, 2007).

Tal como noutras culturas, o estado nutricional dos frutos pode influenciar o desenvolvimento da antracnose. Neste sentido, recomendam-se fertilizações equilibradas sobretudo em compostos azotados (Roca *et al.*, 2007). Por outro lado, os compostos de cálcio estão a ser utilizados para controlar a antracnose, porque inibem a atividade das enzimas e toxinas excretadas pelos agentes patogénicos e reforçam a estrutura da parede celular dos tecidos dos frutos (Moral & Trapero, 2009). Vários estudos referem que existe uma relação linear entre o teor de cálcio da azeitona e a sua resistência à antracnose, o que explica que a doença seja endémica em zonas com solos ácidos (Roca *et al.*, 2019).

4.2. Meios de luta genética

Embora a grande maioria, das cultivares de oliveiras portuguesas, seja suscetível à antracnose, foram identificadas várias cultivares com um nível de resistência elevado, o que as torna uma estratégia recomendada para plantações em zonas favoráveis à doença (Moral *et al.*, 2014). Algumas destas cultivares apresentam também resistência combinada a vários

problemas fitossanitários, o que aumenta o seu interesse para novas plantações em zonas de risco para estas doenças. (Moral & Trapero, 2009).

4.3. Meios de luta biológica

Nos últimos anos, a necessidade de minimizar o impacto ambiental dos fungicidas impulsionou a utilização de métodos de controlo biológico, como a utilização de microrganismos antagonistas (fungos, leveduras e bactérias) ou de produtos de origem natural (extratos vegetais) (Moral *et al.*, 2018). Os métodos de luta biológica não têm sido utilizados comercialmente contra esta doença da oliveira, embora esse seja um objetivo desejável a médio prazo (Moral *et al.*, 2014). A menor eficácia de alguns destes produtos em condições naturais de infeção no campo realça a necessidade de mais investigação antes de estes produtos poderem ser considerados como uma alternativa válida para o controlo da antracnose (Roca *et al.*, 2007).

4.4. Meios de luta química

Os métodos de controlo químico, seguindo as recomendações atuais para a utilização sustentável dos produtos fitofarmacêuticos, devem ser utilizados quando as medidas de combate alternativas são insuficientes. Os compostos de cobre possuem características que motivam a sua utilização, como a resistência à lavagem da chuva, o amplo espectro de ação contra fungos e bactérias, a capacidade de interferir com as toxinas dos agentes patogénicos e o baixo custo (Roca *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2014). Além disso, não foram detetadas populações de fungos tolerantes ao cobre, apesar dos compostos cúpricos serem utilizados na agricultura há mais de 100 anos (Montag *et al.*, 2006; Borkow & Gabbay, 2009). Infelizmente, nas cultivares suscetíveis à antracnose, quando as azeitonas não são colhidas no início da maturação, o controlo eficaz da doença exige a utilização de fungicidas (Moral *et al.*, 2014). Apesar de um declínio acentuado do consumo de fungicidas cúpricos a nível europeu, a sua aplicação continua a ser a medida de controlo mais utilizada para a antracnose da oliveira (Pérez, 2011). A utilização de fungicidas orgânicos é muito limitada durante o outono, uma vez que podem ser lipossolúveis, com possibilidade de permanecerem no azeite durante a lipogénese, o que torna a dependência dos fungicidas cúpricos mais acentuada (Moral & Trapero, 2009).

Os fungicidas cúpricos são preventivos recomendando-se a sua aplicação antes dos períodos de infeção (primeiras chuvas outonais) (Moral *et al.*, 2009). Para aumentar a eficácia da prevenção, o produto deve penetrar no interior da copa das oliveiras. Os compostos cúpricos como: hidróxidos, óxidos, oxicloretos e sulfatos mostram uma elevada eficácia contra o agente patogénico (Moral *et al.*, 2014), observando-se também uma boa eficácia das misturas de compostos cúpricos e orgânicos (Pérez, 2011). A utilização de novos compostos com baixa concentração de cobre, tem-se revestido de grande interesse, por causa da redução significativa da quantidade de cobre permitida na União Europeia (Moral *et al.*, 2018). A frequência e o momento das aplicações variam consideravelmente com a persistência do fungicida, as condições ambientais, a suscetibilidade da cultivar e o nível de infeção existente. O outono é o período de controlo essencial, pois as epidemias da doença ocorrem durante esta estação (Roca *et al.*, 2007).

5. Material e Métodos

5.1. Material

Na obtenção dos azeites, utilizaram-se azeitonas das cultivares ‘Cobrançosa’ e ‘Galega Vulgar’ provenientes de um olival tradicional de sequeiro, localizado na Região da Beira Baixa (39 ° 4901900 N, 7 ° 2703100 W), não sujeito a tratamentos fitossanitários. Realizaram-se quatro colheitas, entre outubro e novembro em três campanhas consecutivas (2019, 2020 e 2021), com uma periodicidade quinzenal.

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterização dos frutos

Em cada data de colheita, determinou-se o índice de maturação das azeitonas (IM), seguindo as orientações do Conselho Oleícola Internacional (COI, 2011). Estimou-se a percentagem de frutos infetados por *Colletotrichum* spp. e estando a mosca-da-zeitona (*Bactrocera oleae*) presente no olival, determinou-se, simultaneamente, a percentagem de azeitonas atacadas por esta praga. As percentagens de incidência de gafa e de mosca resultaram da observação visual do número de frutos com presença de sintomas da doença e/ou presença da praga (picada, ovo, larva pupa e orifício de saída) numa amostra de cem frutos. As observações foram efetuadas em duplicado, num total de duzentos frutos.

5.2.2. Extração do azeite

Imediatamente após cada uma das colheitas, procedeu-se à extração do azeite em sistema Abencor (MC2 Ingenieria y Sistemas S.L., Sevilha, Espanha). As azeitonas foram trituradas em moinho de martelos equipado com crivo de 4 mm a 3000 rpm. A batedura das pastas foi realizada a 27–30 °C, por 30 min, e a centrifugação a 3500 rpm durante 1 min. Após centrifugação, os azeites foram decantados e filtrados.

Nas amostras de azeite avaliaram-se os parâmetros químicos de qualidade: acidez, índice de peróxido e absorvâncias no ultravioleta (K_{232} e K_{270}) bem como o exame organolético e estudou-se a estabilidade oxidativa de cada azeite.

Para o estudo dos compostos bioativos, quantificaram-se os principais ácidos gordos, os compostos fenólicos totais, determinou-se o perfil fenólico das amostras, quantificaram-se os compostos fenólicos abrangidos pela alegação de saúde (hidroxitiroso, tiroso e seus derivados) e determinaram-se os teores de pigmentos clorofilinos e de β -caroteno.

5.2.3. Critérios de qualidade e ácidos gordos principais

Os critérios químicos de qualidade (acidez, índice de peróxido, absorvâncias a 270 e 232 nm) e os ácidos gordos, palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) foram avaliados em quadruplicado por Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) (MPA, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha) e quantificados através de calibrações comerciais (B-Olive-Oil, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A informação espectral foi recolhida em amostras de azeite à temperatura de 50 °C, previamente preparadas e filtradas

segundo a Norma Portuguesa NP-896/86, em modo de absorvância e no comprimento de onda de 12000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} e 32 scans.

Nas amostras onde se verificou não conformidade com a categoria de azeite virgem extra, foram realizadas análises pelos métodos oficiais (Regulamento (UE) n.º 2019/1604). Procedeu-se também, ao exame organolético de todas as amostras de azeite recorrendo a um painel de provadores qualificado (COI, 2018; Regulamento (UE) n.º 2019/1604).

5.2.4. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram recuperados do azeite por micro extração líquido-líquido (MELL). Para a obtenção do extrato fenólico seguiu-se o método descrito por Murkovic *et al.* (2004). Juntou-se 0,5 g de azeite com 1 cm^3 de solução metanol/água 80 % (v/v), agitou-se 1 min em Vortex (Labinco L46), centrifugou-se durante 5 min a 13400 rpm (Minispin 5452 Eppendorf) e retirou-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 5 cm^3 . Este procedimento repetiu-se mais duas vezes. Recolheram-se os 3 extratos, no mesmo balão que se perpez com água ultrapura. Cada extração foi realizada em triplicado.

Os extratos foram avaliados por espectroscopia VIS, num espectrofotómetro Jasco 7800 e detetados a 765 nm de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu. A quantificação foi efetuada numa curva de calibração de ácido gálico (intervalo 0,5-10,0 mg dm^{-3}). Os resultados são apresentados em mg de equivalentes de ácido gálico por quilograma de azeite (mg (EAG) kg^{-1} azeite).

5.2.5. Alegações de saúde

Para a quantificação do hidroxitirosol e tirosol e seus derivados presentes nas amostras de azeite, utilizaram-se os extratos hidrometanólicos obtidos para a quantificação dos compostos fenólicos totais cujo procedimento está descrito no ponto anterior (6.2.4).

É fundamental proceder a uma hidrólise ácida dos extratos fenólicos do azeite para a sua total quantificação, porque uma fração destes compostos encontra-se ligada a outras moléculas (Mastralexi *et al.*, 2014; Tsimidou *et al.*, 2019). Para o processo de hidrólise seguiu-se o método de Nenadis *et al.* (2018), que constou na preparação de três tubos de 2 cm^3 com tampa, contendo 0,5 cm^3 de extrato fenólico e 0,5 cm^3 de H_2SO_4 (1M), agitaram-se em vortex (Labinco L46) 15 segundos, colocaram-se em banho termo estático a 80 °C durante 2 horas e posteriormente arrefeceram-se em banho de gelo.

A análise dos compostos fenólicos hidroxitirosol (Htyr) e tirosol (Tyr) e seus derivados, foi realizada de acordo com Reboredo-Rodriguez *et al.* (2016), num cromatógrafo Agilent, série 1100 (Agilent Technologies Instrument), acoplado de coluna C18 Phenomenex Kinetex (2,6 μm , 100 x 3,00 mm) e detetor de díodos (Agilent 1100). A eluição em gradiente foi realizada com um sistema de solvente água/ácido fórmico (99,5 : 0,5; v/v) como fase móvel A e acetonitrilo como fase móvel B. O tempo total de execução foi de 13 minutos (mais 5 minutos pós-corrida). As condições de eluição do gradiente foram as seguintes: 0 min, 95 % A; 3 min, 80 % de A; 4 min, 60 % de A; 5 min, 55 % A; 9 min, 40 % de A; 10 min, 0 % de A; 12 min, 95 % de A; e 13 min, 95 % de A.

Antes da injeção, os extratos fenólicos hidrolisados foram previamente filtrados através de filtro de seringa Pall Gelman Acrodisc (membrana de 0,45 μm , 25 mm, GHP). O volume de injeção foi 5 mm^3 e taxa de fluxo da fase móvel de 0,7 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ com a coluna mantida a 40 $^\circ\text{C}$. A identificação dos compostos fenólicos (Htyr e Tyr) foi obtida comparando os valores do tempo de retenção com os padrões puros. As concentrações foram calculadas com base em curvas de calibração de Htyr e Tyr, com um intervalo entre 0,1-20 mg dm^{-3} . Os resultados da alegação de saúde apresentaram-se em $\text{mg (Tyr)} 20 \text{ g}^{-1}$ de azeite.

5.2.6. Perfil de compostos fenólicos

O perfil fenólico foi avaliado por HPLC de acordo com o método do Conselho Oleícola Internacional com algumas modificações (COI, 2017). Os compostos fenólicos foram recuperados do azeite por extração líquido-líquido utilizando o procedimento proposto por Pirisi *et al.* (2000).

Resumidamente a extração fenólica constou na pesagem de 2 g de azeite para um tubo falcon de 10 cm^3 , adicionou-se 1 cm^3 de padrão de ácido siringico (0,015 mg cm^{-3}), 1 cm^3 de *n*-hexano e 2 cm^3 de solução metanol/água 80% (v/v). Agitou-se em vórtex (Labinco L46) durante 2 min e levou-se à centrifuga (Orto Alresa - Lince) durante 3 min a 3 000 rpm. Recolheu-se a fase hidroalcoólica para outro tubo falcon de 10 cm^3 , enquanto a fase hexânica se extraiu mais duas vezes com 2 cm^3 de solução metanol/água 80 % (v/v).

De forma a remover o azeite residual no tubo contendo as três fases hidroalcoólicas, adicionaram-se 2 cm^3 de *n*-hexano, levou-se novamente à centrifuga (Orto Alresa modelo Lince) por 3 min a 3 000 rpm, retirou-se a fase hexânica sobrenadante que se descartou (esta operação repetiu-se novamente). Após as duas lavagens com *n*-hexano, transferiu-se o extrato hidroalcoólico para uma ampola de evaporação de 10 cm^3 e levou-se à secura total num evaporador rotativo (Büchi Rotavapor R-114) com banho termo estático a 35 $^\circ\text{C}$. O extrato seco foi retomado com 0,5 cm^3 de solução metanol/água 50 % (v/v) e filtrou-se através de filtro de seringa Pall Gelman Acrodisc (membrana de 0,45 μm , 25 mm, GHP).

Para a quantificação foi utilizado um sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies), constituído por um desgaseificador, uma bomba quaternária e um detetor UV ($\lambda = 280\text{nm}$). Utilizou-se uma coluna Purospher C18 (250 mm x 3,9 mm x 4 mm) em forno a 30 $^\circ\text{C}$. A injeção foi de 20 μL com tempo de corrida de 82 minutos. A fase móvel consistiu em soluções de (A) Água com 0,2 % H_3PO_4 (v/v), (B) metanol e (C) acetonitrilo com um caudal constante de 1 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ foi o indicado pelo documento COI/T. 20/Doc. No 29 (COI, 2017) (Tabela 4).

Tabela 4- Programa de gradiente utilizado para determinação do perfil fenólico.

Tempo (min)	A %	B %	C%
0	96	2	2
40	50	25	25
45	40	30	30
60	0	50	50
70	0	50	50
72	96	2	2
82	96	2	2

Fonte: COI/T. 20/Doc. No 29 (COI, 2017).

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de padrão interno de acordo com o mesmo documento (COI, 2017). Os resultados são apresentados em mg (tirosol) kg⁻¹ de azeite.

5.2.7. Pigmentos clorofilinos

A quantificação dos pigmentos clorofilinos foi efetuada através da medição das absorvâncias a 630, 670 e 719 nm, utilizando-se o ar como referência, de acordo com o método IUPAC proposto por Pokorný *et al.* (1995). Foi utilizado um espectrofotômetro Biochrom Libra S21. O teor em pigmentos clorofilinos (PC) expressos em (mg de feofitina kg⁻¹ de azeite) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$PC \text{ (mg feofitina.kg}^{-1}\text{)} = \frac{345,3 \times (Abs_{670} - (0,5 \times Abs_{630}) - (0,5 \times Abs_{719}))}{10}$$

Onde:

PC - Teor em pigmentos clorofilinos (mg de feofitina/kg de azeite)

Abs λ - Absorvância medida no comprimento de onda λ

5.2.8. β -caroteno

A extração de β -caroteno basou-se na metodologia descrita por Minguez-Mosquera *et al.* (1990) sem saponificação. Consiste numa extração líquido-líquido, em que os diferentes grupos de carotenoides - carotenos e xantofilas - são separados por duas fases: dimetilformamida (DMF), que retém clorofilas e xantofilas, e *n*-hexano, que retém o β -caroteno.

Assim, para a extração, pesaram-se 1,5 g de azeite para um tubo falcon de 50 cm³ com tampa, adicionaram-se 15 cm³ de DMF e 7 cm³ de *n*-hexano, agitou-se em vórtex (Labinco L46) durante 1 min e levou-se à centrifuga (Orto Alresa - Lince) durante 5 min a 5000 rpm. Recolheu-se a fase superior (hexânica) para um balão volumétrico de 25 cm³. A adição de 7 cm³ de *n*-hexano e as restantes operações repetiram-se mais duas vezes, juntando os três extratos no mesmo balão volumétrico de 25 cm³ que se per fez com *n*-hexano. Os extratos, após filtrados através de filtro de seringa Pall Gelman Acrodisc (membrana de 0,45 μ m, 25 mm, GHP), foram imediatamente avaliados num espectrofotômetro Jasco 7800 e detetados no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram calculadas com o auxílio de uma curva de calibração de β -caroteno, no intervalo de 5-200 μ g cm⁻³. Os resultados apresentam-se em mg (β -caroteno) kg⁻¹ de azeite.

5.2.9. Estabilidade oxidativa

A determinação deste parâmetro foi realizada em equipamento Rancimat 679 da Metrohm. As condições operacionais foram as seguintes: 4 cm³ de azeite, temperatura do bloco de aquecimento de 120 °C e fluxo de ar de 20 L/h. Os produtos voláteis de oxidação resultantes do ensaio e arrastados pelo fluxo de ar foram recolhidos num vaso com 60 cm³ de água desionizada à temperatura ambiente. Ao longo do ensaio, os elétrodos de platina verificam o aumento da condutividade, resultando na obtenção de um registo automático

do tempo de indução, para cada amostra, sendo o valor máximo de condutividade de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Os resultados são expressos em hora, referindo-se ao momento de inflexão da curva de condutividade que coincide com o fim do período de indução.

5.2.10. Tratamento estatístico dos resultados

A análise estatística dos resultados foi efetuada utilizando o software StatisticaTM, versão 7, da Statsoft, Tulsa, OK, EUA. Foi realizada uma análise de variância a um fator (ANOVA) e comparação dos valores médios utilizando um teste *post hoc* de Tukey, para um nível de significância de 0,05.

Todas as análises descritas nos capítulos seguintes para a caracterização dos azeites foram realizadas em triplicado ou em quadruplicado e calculadas as médias dos resultados. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

6. Resultados e Discussão

6.1. Caracterização dos frutos

Durante três campanhas consecutivas (2019, 2020 e 2021), realizaram-se quatro colheitas de azeitonas das cultivares 'Galega Vulgar' e 'Cobrançosa', entre outubro e novembro com uma periodicidade quinzenal, nas quais se avaliaram os índices de maturação (IM) e os níveis de incidência de gafa e de mosca-da-zeitona. Os resultados experimentais encontram-se representados na Tabela 5.

Podemos verificar que em ambos os olivais, nas três campanhas, houve presença de gafa (doença) e de mosca (praga) e que a sua incidência foi aumentando, em geral, ao longo da maturação dos frutos.

Em cada momento de colheita, a cultivar 'Cobrançosa' apresentou índices de maturação quase sempre inferiores ao da cultivar 'Galega', registrando os menores índices de maturação na campanha de 2021 (Tabela 5).

Tabela 5 - Incidência de gafa e mosca-da-zeitona (%) nas azeitonas das cultivares 'Galega' e 'Cobrançosa' e respectivos índices de maturação avaliados nas 3 campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021).

Cultivar Campanha	Colheita	Incidência de gafa nos frutos (%)	Incidência de mosca nos frutos (%)	IM	Cultivar Campanha	Colheita	Incidência de gafa nos frutos (%)	Incidência de mosca nos frutos (%)	IM
'Galega' 2019	T1	9	47	3,13	'Cobrançosa' 2019	T1	0	36	1,60
	T2	5	57	3,11		T2	30	83	3,79
	T3	51	82	4,22		T3	47	63	3,50
	T4	70	35	5,74		T4	64	36	5,13
'Galega' 2020	T1	3	44	1,87	'Cobrançosa' 2020	T1	6	29	2,38
	T2	5	16	2,94		T2	4	14	3,35
	T3	26	42	4,82		T3	4	26	3,91
	T4	91	44	6,40		T4	12	40	4,66
'Galega' 2021	T1	0	15	2,14	'Cobrançosa' 2021	T1	0	27	0,95
	T2	0	41	3,46		T2	0	46	1,94
	T3	3	59	3,82		T3	24	73	2,71
	T4	91	72	5,09		T4	9	28	3,76

Além disso verifica-se uma relação entre a praga e a doença, ou seja, geralmente após um aumento na incidência da praga há uma resposta positiva na incidência da doença (Tabela 5) nomeadamente nos meses onde ocorre precipitação e temperaturas amenas (Figura 3). Tal está em concordância com os estudos que referem, que as infestações de mosca-da-zeitona (*Bactrocera oleae*) são frequentemente acompanhadas por infeções de gafa nas azeitonas em simultâneo com temperatura atmosférica amena (15–20 °C) e condições de humidade relativa elevadas que prevalecem em outubro e novembro (Gucci *et al.*, 2012). Por outro lado, também o estado de maturação das azeitonas é descrito como um fator crítico para o desenvolvimento da antracnose (Moral *et al.*, 2008, Leoni *et al.*, 2018).

Considerando os valores dos índices de maturação e os de incidência de praga e de doença verificamos que foram distintos nos três anos deste estudo. Estando estes parâmetros diretamente relacionados com as condições ambientais, a Figura 3 mostra que as condições climáticas durante as três campanhas registaram valores médios mensais

muito diferentes. No que respeita à precipitação e à temperatura, apercebemo-nos que os anos de 2020 e 2021 apresentaram condições ideais para a germinação de esporos e desenvolvimento do fungo do género *Colletotrichum*, nomeadamente no período de colheita (outubro/novembro) onde a cultivar ‘Galega Vulgar’ já tem muitas vezes a maior parte dos seus frutos na fase de pintor. Assim, constatamos que a cultivar ‘Galega Vulgar’ apresenta níveis de incidência de gafa superiores, comparativamente à cultivar ‘Cobrançosa’, atingindo mais de 90 % nas campanhas de 2020 e 2021, sempre acompanhada de grandes estragos nos frutos.

Por sua vez, a cultivar ‘Cobrançosa’ registou o nível de gafa mais elevado na campanha de 2019 (64 %), tendo sido bastante inferior nas campanhas de 2020 e 2021 com incidências máximas de 12 e 9 %, respetivamente. Porém, incluindo o ano de 2019, a incidência de gafa nos frutos ‘Cobrançosa’ não foi acompanhada de elevada severidade como foi o caso da cultivar Galega (dados não apresentados).

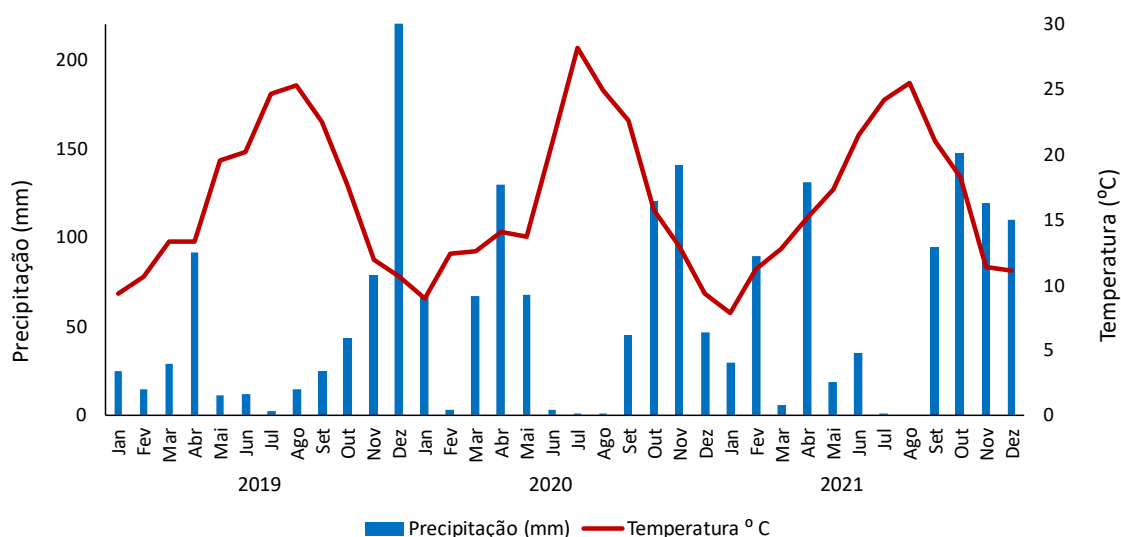


Figura 3- Valores médios mensais de temperatura e precipitação registados na região de Castelo Branco nos anos de 2019, 2020 e 2021 (Projeto Modolive (2019, 2020); IPMA, 2021).

Tal como referido anteriormente, os frutos da cultivar ‘Galega Vulgar’ são mais suscetíveis à antracnose do que os frutos da cultivar ‘Cobrançosa’ (Gomes *et al.*, 2012; Talhinhos *et al.*, 2015; Gouvinhas *et al.*, 2016; Peres *et al.*, 2021). Diferenças relacionadas com as características da cutícula dos frutos poderão determinar as diferenças registadas entre as cultivares face à incidência e severidade da gafa (Gomes *et al.*, 2012). Na verdade, quanto mais espessa for a cutícula do fruto, maior resistência apresenta à entrada dos agentes patogénicos. Sendo descrito que as azeitonas ‘Galega’ apresentam células epidérmicas muito finas, poderá explicar a sua menor proteção à entrada do fungo (Gomes *et al.*, 2012).

6.2. Caracterização dos azeites

6.2.1. Critérios de qualidade

A caracterização dos azeites virgens resultantes de azeitonas infetadas pela doença da gafa poderá conceder informação que permita conhecer a influência deste fator sobre os seus compostos químicos e atributos sensoriais. Essa informação poderá permitir ao agricultor decidir o momento ideal de colheita como meio de controlo da antracnose (Aparício & Luna, 2002).

Os resultados relativos aos critérios de qualidade avaliados nos azeites Galega e Cobrançosa nas três campanhas deste estudo, encontram-se resumidos nas Tabela 6 e 7, respetivamente.

Fazendo uma análise global dos resultados expressos nas Tabela 6 e 7 podemos verificar que nos azeites das duas cultivares, todos os critérios de qualidade avaliados estão de acordo com o Regulamento (UE) n.º 2019/1604 para a categoria de azeite virgem extra (AVE), com exceção dos azeites Galega da última colheita (T4) dos anos 2020 e 2021 (Tabela 6).

Tabela 6 - Critérios de qualidade (acidez, índice de peróxido (IP), K_{232} , K_{270} e exame organolético) nos azeites Galega avaliados nas 3 campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

Cultivar Campanha	Colheita	Acidez (% ác. oleico)	IP (meqO ₂ kg ⁻¹)	K_{232}	K_{270}	Exame organolético (Mediana)			
						Frutado Verde	Amargo	Picante	Mofo
'Galega' 2020	T1	0,38 \pm 0,00 ^c	8,60 \pm 0,24 ^{a*}	1,65 \pm 0,02 ^b	0,17 \pm 0,01 ^a	6,15	7,70	7,70	–
	T2	0,37 \pm 0,00 ^c	9,90 \pm 0,13 ^b	1,76 \pm 0,01 ^a	0,13 \pm 0,01 ^b	7,25	7,35	7,80	–
	T3	0,50 \pm 0,00 ^b	7,40 \pm 0,08 ^c	1,57 \pm 0,01 ^c	0,13 \pm 0,01 ^b	4,60	4,90	4,60	–
	T4	0,64 \pm 0,00 ^a	6,53 \pm 0,07 ^d	1,50 \pm 0,01 ^d	0,12 \pm 0,01 ^b	5,95	6,20	1,85	–
'Galega' 2021	T1	0,34 \pm 0,00 ^b	9,95 \pm 0,18 ^a	1,68 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,01 ^a	6,10	9,15	8,95	–
	T2	0,23 \pm 0,00 ^c	8,54 \pm 0,18 ^b	1,57 \pm 0,02 ^b	0,12 \pm 0,00 ^d	4,65	7,30	5,25	–
	T3	0,23 \pm 0,01 ^c	4,30 \pm 0,18 ^c	1,50 \pm 0,02 ^c	0,10 \pm 0,01 ^c	3,40	4,60	2,85	–
	T4	1,52 \pm 0,01 ^a	3,18 \pm 0,58 ^d	1,46 \pm 0,02 ^d	0,10 \pm 0,02 ^c	0,05	0,05	0,05	1,2
'Galega' 2022	T1	0,32 \pm 0,00 ^c	9,02 \pm 0,05 ^a	1,71 \pm 0,01 ^a	0,13 \pm 0,01 ^a	3,90	2,80	4,35	–
	T2	0,33 \pm 0,00 ^c	6,50 \pm 0,03 ^b	1,53 \pm 0,02 ^c	0,11 \pm 0,01 ^b	3,35	2,25	3,75	–
	T3	0,42 \pm 0,00 ^b	4,23 \pm 0,15 ^c	1,38 \pm 0,01 ^d	0,07 \pm 0,01 ^c	1,65	0,00	0,65	–
	T4	2,12 \pm 0,00 ^a	4,33 \pm 0,10 ^c	1,56 \pm 0,01 ^b	0,13 \pm 0,01 ^a	0,15	0,00	0,00	1,9
Categoria		Limites legislados							
Azeite Virgem Extra	\leq 0,8	\leq 20	\leq 2,50	\leq 0,22	Mediana frutado > 0	Mediana defeito = 0			
Azeite Virgem	\leq 2	\leq 20	\leq 2,60	\leq 0,25	Mediana frutado > 0	Mediana defeito < 3,5			

*- Letras diferentes, na mesma coluna, significa que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no mesmo ano (teste de Tukey).

No caso do azeite Galega colheita T4 de 2020, por apresentar um valor de acidez de 1,52 % ($> 0,8\%$) e uma mediana de defeito de 1,2, segundo o mesmo Regulamento, é classificado como azeite virgem (AV), enquanto o azeite Galega T4 de 2021 é considerado lampante por apresentar um valor de acidez superior a 2 % (valor máximo permitido para a categoria AV) (Tabela 6).

Apesar de se verificar em várias colheitas de azeitona Galega nos 3 anos uma elevada percentagem de frutos infetados pela gafa em alguns momentos de colheita (T3 e T4 em 2019, T3 e T4 em 2020 e T4 em 2021), a acidez livre só atinge valores bastante elevados em

T4 (2020 e 2021), quando o grau de destruição dos frutos é já bastante grande (90 % de frutos com incidência de gafa). A época de colheita influencia pouco a acidez do azeite, se partirmos de frutos sãos (Peres *et al.*, 2006) ou quando a severidade da doença não é muito elevada (Leoni, *et al.*, 2018). De facto, em 2019, apesar da percentagem de frutos com incidência de gafa também ser muito elevada em T3 e T4, a severidade da doença era muito menor do que em T4 em 2020 e 2021 (dados não apresentados).

Tabela 7 - Critérios de qualidade (acidez, índice de peróxido (IP), K_{232} , K_{270} e exame organolético) nos azeites Cobrançosa avaliados nas três campanhas sucessivas (2019,2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

Cultivar Campanha	Colheita	Acidez (% ác. oleico)	IP (meq O ₂ kg ⁻¹)	K_{232}	K_{270}	Exame organolético (Mediana)			
						Frutado Verde	Amargo	Picante	Mofo
'Cobrançosa ' 2019	T1	0,26 \pm 0,01 ^{d*}	15,23 \pm 0,12 ^a	2,05 \pm 0,01 ^a	0,19 \pm 0,01 ^a	7,05	8,10	7,95	–
	T2	0,30 \pm 0,00 ^c	11,63 \pm 0,15 ^b	1,97 \pm 0,01 ^b	0,16 \pm 0,01 ^b	7,05	7,30	7,60	–
	T3	0,45 \pm 0,00 ^a	10,93 \pm 0,07 ^b	1,85 \pm 0,01 ^c	0,14 \pm 0,00 ^b	5,25	6,80	6,00	–
	T4	0,42 \pm 0,01 ^b	11,43 \pm 0,13 ^b	1,86 \pm 0,01 ^c	0,12 \pm 0,00 ^c	5,90	8,70	6,20	–
'Cobrançosa ' 2020	T1	0,34 \pm 0,01 ^a	15,41 \pm 0,10 ^a	1,95 \pm 0,02 ^b	0,19 \pm 0,01 ^a	4,35	9,45	9,80	–
	T2	0,28 \pm 0,01 ^b	13,06 \pm 0,11 ^b	2,02 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,01 ^b	4,30	9,10	9,55	–
	T3	0,28 \pm 0,00 ^b	11,20 \pm 0,11 ^c	1,93 \pm 0,01 ^b	0,10 \pm 0,00 ^c	5,05	8,15	7,30	–
	T4	0,22 \pm 0,00 ^c	7,69 \pm 0,07 ^d	1,78 \pm 0,01 ^c	0,09 \pm 0,01 ^c	1,65	7,60	6,75	–
'Cobrançosa ' 2021	T1	0,32 \pm 0,01 ^c	12,55 \pm 2,17 ^a	1,87 \pm 0,03 ^a	0,18 \pm 0,04 ^a	6,50	6,15	7,25	–
	T2	0,34 \pm 0,02 ^b	11,21 \pm 0,09 ^{ab}	1,77 \pm 0,02 ^b	0,15 \pm 0,01 ^b	6,30	5,75	7,15	–
	T3	0,34 \pm 0,01 ^b	10,91 \pm 0,15 ^{ab}	1,73 \pm 0,02 ^{bc}	0,14 \pm 0,01 ^b	5,50	5,65	6,50	–
	T4	0,39 \pm 0,00 ^a	10,13 \pm 0,77 ^b	1,71 \pm 0,03 ^c	0,10 \pm 0,01 ^c	4,05	4,60	4,55	–
Categoria		Limites legislados							
Azeite Virgem Extra		0,8	20	2,5	0,22	Mediana frutado > 0		Mediana defeito = 0	
Azeite Virgem		2	20	2,6	0,25	Mediana frutado > 0		Mediana defeito < 3,5	

*. Letras diferentes, na mesma coluna, significa que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no mesmo ano (teste de Tukey).

Os resultados obtidos para a acidez estão em concordância com os valores encontrados por outros autores, sendo o efeito da gafa na acidez do azeite bem conhecido (Cacciola *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2008; Moral *et al.*, 2014; Leoni *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2021; Abacigil *et al.*, 2023). Alguns autores referem limiares de incidência de gafa entre 4–20 % e 40–45 %, para os azeites perderem a qualificação de azeite virgem extra e de azeite virgem, respetivamente, por apresentarem valores de acidez superiores aos limites legais para aquelas categorias (Iannotta *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2008; Leoni *et al.*, 2018). Porém, no presente estudo os valores de acidez superiores a 0,8 e 2 %, que correspondem aos limites para o AVE e o AV, respetivamente, foram observados para níveis de incidência de gafa superiores aos reportados nesses estudos. Na verdade, os trabalhos publicados foram desenvolvidos em ambiente controlado a partir de inoculações artificiais, com agentes patogénicos conhecidos em frutos colhidos, enquanto o presente estudo foi efetuado em condições de campo. No campo, as infeções de antracnose acontecem com os frutos na árvore, o que poderá conferir maior proteção dos constituintes químicos dos frutos aos efeitos do agente patogénico. Vários autores referem que em condições de stresse, as plantas têm vários mecanismos de defesa para se protegerem (Del Rio *et al.*, 2003; Báidez *et al.*, 2006; Miles *et al.*, 2008; De Bona *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013).

Nos três anos sucessivos, independentemente da incidência de gafa, os azeites Galega apresentaram índice de peróxido (IP) (9,95 e 3,18 meq O₂ kg⁻¹) e K_{232} (1,76 e 1,38) mais

baixos, comparativamente aos azeites Cobrançosa, cujos valores de IP e de k_{232} variaram entre 15,41 e 7,69 meq O_2 kg^{-1} e entre 2,05 e 1,71, respetivamente (Tabela 6 e Tabela 7), havendo diferenças significativas nos índices de peróxido e nos de K_{232} , entre as 4 colheitas de cada campanha, em ambas as cultivares ($p \leq 0,05$).

Nas três campanhas, os valores mais elevados registados para os três parâmetros que medem a oxidação verificaram-se sempre nos azeites das primeiras colheitas (T1 e T2), em ambas as cultivares (Tabela 6 e Tabela 7), mostrando não haver efeito da doença sobre os parâmetros de oxidação. Contudo, a presença de mosca aliada às elevadas temperaturas registadas nos momentos de colheita T1 e T2 (Tabela 5 e Figura 3) poderão ser responsáveis por estes resultados, uma vez que os orifícios de saída das larvas deixam a polpa da azeitona exposta ao ar atmosférico, podendo ocorrer oxidação dos ácidos gordos (Malheiro *et al.*, 2015). Para além disso, os azeites Cobrançosa apresentam teores elevados de compostos de oxidação primária (medidos pelo IP e K_{232}), porque a sua composição em ácidos gordos é mais rica em ácidos gordos polinsaturados (Peres *et al.*, 2016a).

Tal como nos critérios químicos, os resultados do exame organolético efetuado nos azeites Cobrançosa (Tabela 6 e Tabela 7) revelam que este critério de qualidade está de acordo com o Regulamento (UE) n.º 2019/1604 para a categoria de azeite virgem extra (AVE). Estes resultados reforçam os registos de outros autores, ao referirem que azeites obtidos de azeitonas infetadas por *Colletotrichum*, sobretudo os azeites de cultivares mais sensíveis à doença, têm notas sensoriais negativas, com defeitos característicos como, mofo, bolor e madeira húmida (Conde *et al.*, 2013a; Da Silva, 2016; Peres *et al.*, 2021). Segundo os mesmos autores, em azeites de azeitonas com a mesma taxa de infeção, mas de cultivares mais resistentes à gafa, a perceção dos defeitos pode acontecer mais tarde, porque a presença de frutados e amargos muito intensos podem sobrepor-se aos defeitos camuflando a sua presença (Conde *et al.*, 2013a; Peres *et al.*, 2021).

Avaliando os resultados representados nas Tabela 6 e 7 relativos ao exame organolético das três campanhas, constatamos que os melhores resultados sensoriais para azeites das duas cultivares, nas 4 colheitas, se registaram na campanha de 2019. De uma maneira geral, os azeites Cobrançosa, nas três campanhas, apresentaram sensações mais elevadas de frutado, amargo e picante, tendo registado os piores valores em 2020. Em contraste, nos três anos, os azeites Galega apresentaram sempre notas sensoriais positivas mais baixas, observando-se os piores resultados dos seus atributos sensoriais na campanha de 2021 (Tabela 6 e Tabela 7). Nos três anos as intensidades mais elevadas de frutado, amargo e picante acontecem na primeira colheita T1 verificando-se a sua diminuição com a maturação dos frutos e com a incidência de gafa (Tabela 5).

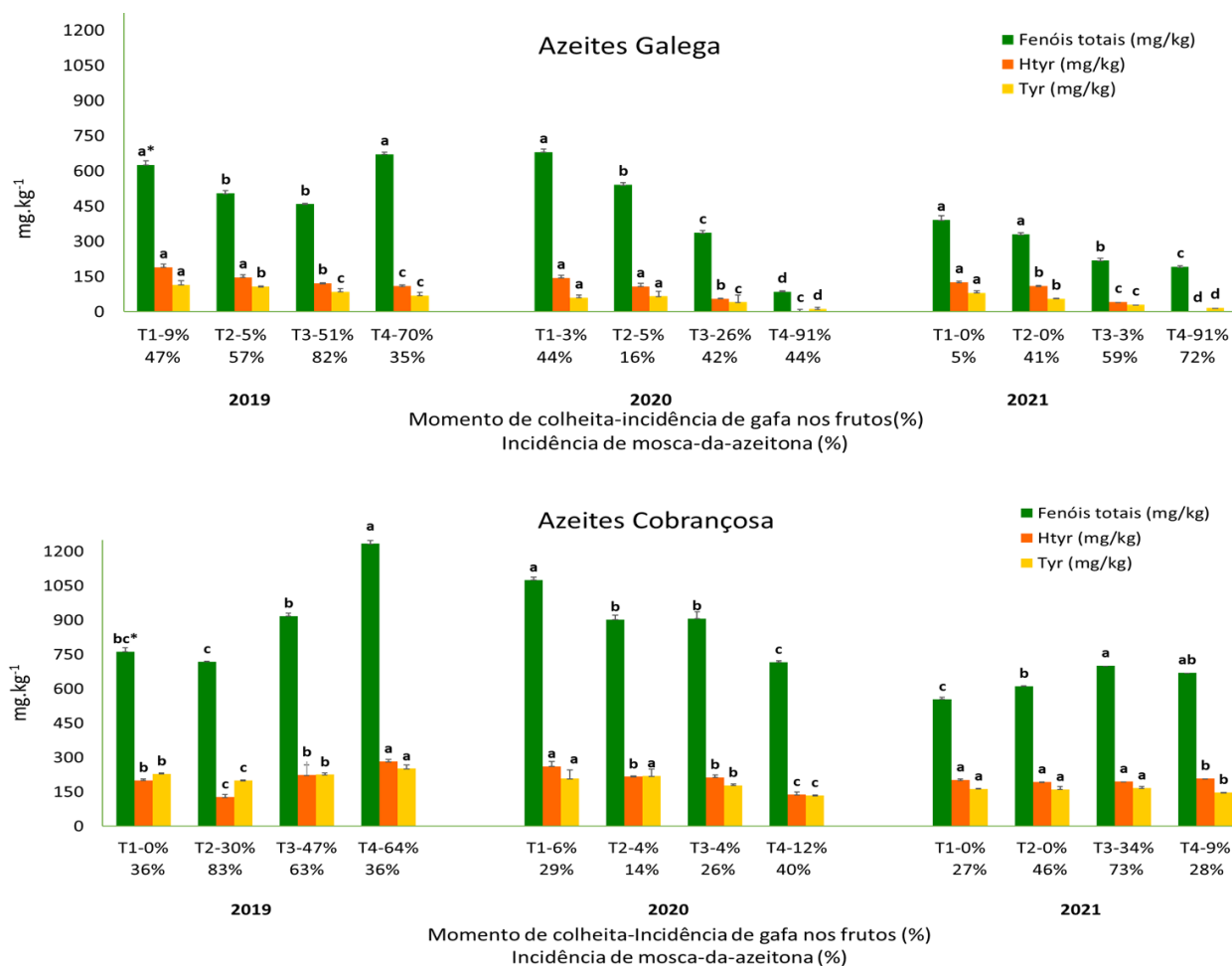
A cultivar 'Cobrançosa' é considerada moderadamente suscetível à doença (Xavier, 2015; Moral *et al.*, 2017) e os seus azeites são reconhecidos pela elevada intensidade de notas amargas e picantes, razão pela qual este azeite é normalmente utilizado nas misturas de "azeites virgens extra premium" (Gouveia *et al.*, 2019; Gouveia *et al.*, 2022). Do ponto de vista sensorial, embora não tenham apresentado defeitos, observou-se uma diminuição de todos os atributos positivos nos azeites Cobrançosa. Assim, a presença de pragas e doenças fúngicas pode comprometer a utilização dos azeites Cobrançosa em loteamentos de azeites premiados, principalmente devido à diminuição da intensidade destes atributos.

6.2.2. Compostos fenólicos totais e alegação de saúde

A alegação “Polifenóis do azeite” é de grande importância, já que os polifenóis presentes no azeite são os únicos, até ao momento, a obter uma alegação, não obstante existirem outros alimentos com compostos antioxidantes. É também a única alegação específica para o azeite que não pode ser usada por outros óleos vegetais (Saillard, 2014).

A fração fenólica total do azeite pode funcionar como um indicador das características organolépticas e do grau de proteção antioxidante dos azeites virgens. Embora este parâmetro, avaliado por espectroscopia VIS, não seja adequado para avaliar os compostos fenólicos abrangidos pela alegação de saúde, pode, no entanto, servir como indicador para realizar uma pré-seleção de amostras que podem suportar a alegação (Servili, 2014).

Durante as três campanhas foi avaliada a evolução dos compostos fenólicos responsáveis pela alegação de saúde do azeite (hidroxitirosol + tirosol) bem como a dos compostos fenólicos totais nos azeites Galega e Cobrançosa em estudo. Após se ter procedido a uma hidrólise ácida dos extratos fenólicos, para a quantificação dos teores de hidroxitirosol (Htyr) e tirosol (Tyr) presentes nos azeites, na Figura 4 encontram-se reunidos os resultados dos parâmetros avaliados.



*- Letras diferentes significa que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) baseadas no teste de Tukey, entre tempos de colheita no ano, para cada grupo de compostos.

Figura 4- Fenóis totais, hidroxitirosol e tirosol nos azeites Galega e Cobrançosa (mg kg^{-1}) avaliados nas três campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

A observação da Figura 4, indica-nos que, de um modo geral, em cada campanha o teor dos compostos fenólicos foi decrescendo ao longo da maturação e com a incidência de gafa, apresentando diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre colheitas. Nas três campanhas os teores máximos e mínimos de fenóis totais registados nos azeites Galega foram respetivamente, 671,0 e 458,5 mg kg⁻¹ em 2019, 681,0 e 85,0 mg kg⁻¹ em 2020 e 390,8 e 190,8 mg kg⁻¹ em 2021. Os azeites Cobrançosa apresentaram teores máximos e mínimos de 1233,6 e 718,7 mg kg⁻¹ no primeiro ano, de 1075,6 e 716,0 mg kg⁻¹ no segundo ano e de 700,1 e 554,8 mg kg⁻¹ no terceiro ano, respetivamente.

A redução do teor de compostos fenólicos, simultaneamente com o aumento da incidência e progresso de doenças, está de acordo com o reconhecido papel dos fungos na biodegradação de compostos fenólicos naturais, a maioria deles produtores de fenol oxidases (Mendonça, *et al.*, 2004; Martínková, *et al.*, 2016).

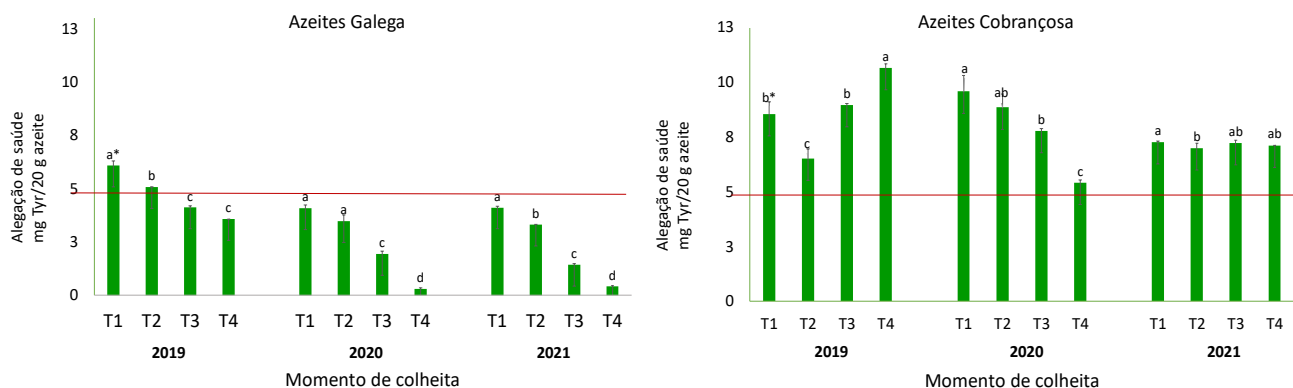
No entanto na campanha de 2019, nos azeites das duas cultivares embora mais evidente nos azeites Cobrançosa verifica-se um aumento do teor de fenóis totais nas últimas colheitas (T3 e T4) em relação aos restantes anos, possivelmente por já terem caído parte dos frutos com maior severidade da doença (Figura 4), porque se observa uma diminuição da percentagem de mosca-da-zeitona no momento de colheita seguinte (Tabela 5). Por outro lado, nos momentos de colheita T2 cultivar 'Cobrançosa' e T3 cultivar 'Galega' a mosca-da-zeitona atingiu o maior nível de incidência (> 80 %) no olival. A sua elevada incidência poderá ter desencadeado o mecanismo de defesa dos frutos, causando o aumento dos teores dos compostos fenólicos tal como refere Gouvinhas *et al.* (2019). Além disso, os elevados níveis de incidência da praga poderão explicar também, o incremento de incidência de gafa observado na colheita posterior (Tabela 5).

A Figura 4 mostra claramente a diferença genética das duas cultivares em relação à composição fenólica, e também as grandes variações nos teores observados na mesma cultivar, ao longo dos três anos (Figura 4). O ano que mais se destacou foi o de 2021, onde os teores de compostos fenólicos totais e de hidroxitirosol e tirosol, nos azeites das duas cultivares, foram sempre inferiores aos obtidas nos anos anteriores. Contudo, nas três campanhas, os teores de hidroxitirosol foram quase sempre superiores aos teores de tirosol (Figura 4).

Nos três anos, os teores máximos e mínimos de hidroxitirosol nos azeites Cobrançosa foram, respetivamente, de 281,9 e 123,4 mg kg⁻¹, enquanto os de tirosol foram de 251,0 e 133,5 mg kg⁻¹. Comparativamente, nos azeites Galega, os teores máximos e mínimos foram de 189,71 e 2,76 mg kg⁻¹ para o hidroxitirosol, e para o tirosol de 114,9 e 11,6 mg kg⁻¹, respetivamente (Figura 4).

A presença da alegação de saúde na rotulagem pode representar um instrumento para a diferenciação e valorização dos azeites, funcionando como um indicador de 'azeite de elevada qualidade'. Para isso, o azeite tem de ter um valor mínimo de 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados por 20 g de azeite (EFSA, 2011).

O principal interesse deste estudo, a nível da comercialização dos azeites virgens extra, é a verificação da elegibilidade para a alegação de saúde (Hidroxitirosol + Tirosol) nos azeites Galega e Cobrançosa em avaliação, nas três campanhas. A Figura 5 apresenta os teores de Htyr e Tyr presentes em 20 g de cada azeite, de modo a avaliar se esse azeite cumpre com a alegação de saúde "Polifenóis do azeite".



*. Letras diferentes significam que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no ano.

Figura 5 - Alegação de saúde (Htyr+Tyr) nos azeites Galega e Cobrançosa (mg Tyr/20g de azeite) avaliados nas três campanhas sucessivas (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

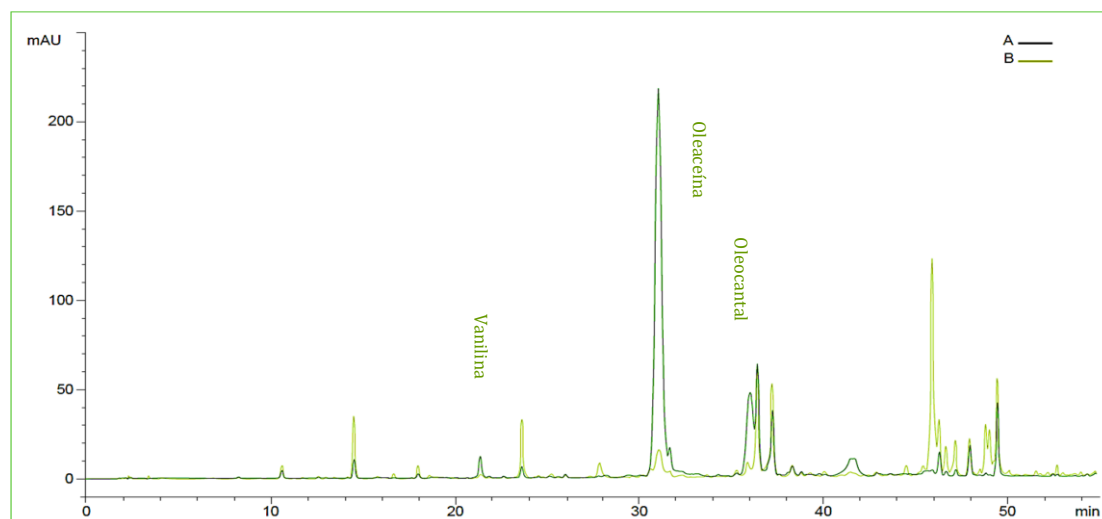
Embora não exista uma correlação clara entre as percentagens de incidência de gafa e o teor fenólico do azeite, os resultados mostram que a concentração de Htyr+Tyr é superior a 5 mg/20 g, para todos os azeites Cobrançosa, ao longo da maturação, nas três campanhas e independentemente da incidência de gafa (Figura 5). Pelo contrário, nas campanhas de 2020 e 2021, nenhum azeite Galega cumpriu a alegação, mesmo em início de maturação e para níveis de incidência da doença reduzidos. Na campanha de 2019, apenas os azeites Galega de início de maturação cumprem com a exigência da alegação de saúde (Figura 5).

Em estudos anteriores, sobre azeites obtidos de azeitonas sãs ($IM \approx 3,5$) (Gouveia, 2019), obtiveram-se resultados para azeites Galega de 9,2 mg/20 g e para azeites Cobrançosa de 12,4 mg/20 g. Assim, estes dados podem indicar que a presença da gafa (e mosca-da-zeitona) podem ter um efeito negativo sobre os compostos responsáveis pela alegação, indicando que mesmo para baixa incidência de gafa, os azeites Galega não cumprem a alegação.

6.2.3. Perfil de compostos fenólicos

O azeite contém um vasto número de substâncias bioativas que atuam como antioxidantes, entre as quais compostos fenólicos hidrofílicos como álcoois e ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos e secoiridoides (Servili *et al.*, 2009). Na Tabela 8 e na Tabela 9 encontram-se os teores dos compostos fenólicos individuais maioritários dos azeites Galega e Cobrançosa em duas (2019 e 2020) das três campanhas avaliadas neste estudo.

Relativamente aos compostos maioritários referidos na literatura, a oleaceína (HTY-EDA) é o principal composto presente no azeite virgem. A Figura 6 mostra graficamente o efeito da incidência de gafa sobre este e outros compostos nos azeites da cultivar 'Galega Vulgar' da campanha 2020, verificando-se o seu quase desaparecimento no momento T4 (91 % de gafa). Este secoiridoide diminui de 242,54 para 2,5 mg kg⁻¹ nessa campanha, como se pode comprovar na Tabela 8.



A - IM = 3 e incidência de antracnose 5 % (T2 - 2020); B - IM = 6 e incidência de antracnose 91% (T4 - 2020)

Figura 6- Perfil fenólico de azeites Galega (HPLC-UV-280 nm).

Na campanha anterior o teor deste composto manteve-se em cerca de 200 mg kg⁻¹ em todas as colheitas. Este composto, juntamente com o oleocantal (TYR-EDA), estão relacionados com a alegação de saúde, porque contribuem para o conjunto dos compostos hidrolisados, e têm uma forte relação com as características sensoriais, nomeadamente com o sabor amargo (Andrewes *et al.*, 2003; Beauchamp *et al.*, 2005).

Tal como se pode observar nas Tabelas 8 e 9, na campanha de 2020 estes dois compostos diminuem significativamente ($p \leq 0,05$) nos azeites Cobrançosa e Galega no momento T4, provavelmente mais em resultado da presença de gafa do que da maturação.

Tabela 8- Compostos fenólicos maioritários identificados por HPLC nos azeites Galega (quantificação de acordo com COI (2017) em mg de tirosol/kg, para quatro tempos de colheita e em dois anos consecutivos (2019 e 2020) (valores médios de quatro cromatogramas, 2 amostras independentes).

ANO	2019				2020			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Composto fenólico (mg kg ⁻¹)								
Hidroxitirosol	17,39 ^a *	13,63 ^b	12,15 ^b	13,45 ^b	4,26 ^{cd}	1,77 ^d	5,81 ^c	1,11 ^d
Tirosol	5,47 ^{ab}	5,16 ^{abc}	4,33 ^{bc}	5,16 ^{abc}	4,11 ^{bc}	3,76 ^b	4,63 ^{bc}	6,45 ^a
Vanilina	5,80 ^a	5,81 ^a	4,64 ^b	2,24 ^c	5,32 ^{ab}	3,85 ^{bc}	3,02 ^{bc}	0,73 ^d
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,55 ^c	2,56 ^c	2,09 ^c	1,92 ^c	3,74 ^b	2,80 ^{bc}	2,54 ^c	7,53 ^a
Oleaceína	261,63 ^{ab}	200,57 ^b	200,51 ^b	242,54 ^{ab}	271,84 ^a	239,24 ^{ab}	88,09 ^c	2,53 ^d
Oleocantal	49,78 ^{bc}	36,84 ^b	37,39 ^b	41,22 ^{ab}	51,93 ^a	47,04 ^{ab}	19,21 ^c	1,68 ^d
Pinoresinol	32,01 ^a	31,03 ^a	32,99 ^a	33,53 ^a	25,68 ^b	23,82 ^b	24,34 ^b	14,12 ^c
Ácido cinâmico	11,53 ^{ab}	10,72 ^b	14,81 ^{ab}	14,09 ^{ab}	14,95 ^{ab}	18,91 ^a	15,60 ^{ab}	14,09 ^{ab}
Luteolina	1,13 ^{ab}	1,32 ^b	1,28 ^{ab}	0,90 ^b	0,58 ^{bc}	0,73 ^b	0,85 ^b	0,45 ^c
Apigenina	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Incidência de gafa (%)	9	5	51	70	3	5	26	91
Incidência de mosca (%)	47	57	82	35	44	16	42	44

< LQ - Inferior ao limite de quantificação (0,4 mg kg⁻¹).

*. Letras diferentes na mesma linha significa que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

De facto, num estudo sobre o efeito da maturação nos fenóis efetuado em azeites obtidos de azeitonas sãs das mesmas cultivares, verificou-se um decréscimo destes compostos com a

maturação, mas as diferenças não foram tão acentuadas (Peres *et al.*, 2016a). Por outro lado, noutro trabalho de maturação, efetuado em azeites da cultivar espanhola 'Brava Gallega', as concentrações dos fenóis individuais aumentaram com a maturação, observando-se aumentos significativos ($p \leq 0,05$) no oleocantal, no tirosol, na luteolina e na apigenina no azeite obtido de azeitonas em sobre maturação (IM = 5,5) (Reboredo-Rodriguez *et al.*, 2020).

Tabela 9 - Compostos fenólicos maioritários identificados por HPLC nos azeites Cobrançosa (quantificação de acordo com COI (2017) em mg tirosol/kg, para quatro tempos de colheita e em dois anos consecutivos (2019 e 2020) (valores médios de quatro cromatogramas, 2 amostras independentes).

ANO	2019				2020			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Composto fenólico (mg kg ⁻¹)								
Hidroxitirosol	27,89 ^{ab}	25,4 ^b	36,46 ^a	30,18 ^{ab}	8,18 ^{cd}	16,99 ^c	9,47 ^{cd}	6,15 ^d
Tirosol	12,93 ^{ab}	13,57 ^{ab}	15,18 ^a	11,36 ^b	3,20 ^c	5,31 ^c	4,98 ^c	3,84 ^c
Vanilina	8,59 ^{ab}	6,21 ^b	7,03 ^{ab}	3,61 ^d	5,55 ^b	9,07 ^a	4,32 ^c	2,76 ^d
Ácido p-cumárico	3,51 ^b	2,46 ^d	2,77 ^c	1,93 ^e	3,90 ^a	3,47 ^b	2,31 ^{cd}	2,11 ^{de}
Oleaceína	144,29 ^b	65,46 ^c	124,39 ^b	149,66 ^b	225,81 ^a	202,75 ^a	139,31 ^b	71,67 ^c
Oleocantal	43,76 ^b	25,82 ^c	29,79 ^c	34,82 ^{bc}	62,56 ^a	73,59 ^a	31,86 ^{bc}	17,25 ^d
Pinosinol	24,25 ^a	14,85 ^{bc}	17,78 ^b	10,99 ^{cd}	13,67 ^{bc}	12,43 ^c	9,40 ^{de}	7,11 ^e
Ácido cinâmico	2,93 ^b	2,86 ^b	2,82 ^b	4,84 ^b	14,59 ^a	9,88 ^{ab}	6,65 ^{ab}	6,28 ^{ab}
Luteolina	6,29 ^b	6,60 ^b	5,57 ^b	14,85 ^a	13,84 ^a	7,68 ^b	11,59 ^a	14,34 ^a
Apigenina	3,69 ^c	4,60 ^{bc}	4,47 ^{bc}	6,91 ^a	4,77 ^{bc}	3,78 ^c	5,61 ^b	6,62 ^{ab}
Incidência de gafa (%)	0	30	47	64	6	4	4	12
Incidência de mosca (%)	36	83	63	36	29	14	26	40

*. Letras diferentes na linha significa que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Os teores dos compostos individuais hidroxitirosol, tirosol, oleaceína, oleocantal, luteolina encontrados nos azeites Galega e Cobrançosa de 2019, encontram-se dentro dos valores encontrados por Rodrigues *et al.* (2019).

A diferença entre os perfis fenólicos dos azeites Galega e Cobrançosa (Tabela 8 e Tabela 9) refletem, como já foi mencionado, fatores genéticos. Os azeites Cobrançosa apresentam maiores teores de flavonoides (luteolina e apigenina), como já tinha sido referido por Peres *et al.* (2016b). O azeite Galega é mais rico em oleaceína, exceto em T3 e T4 em 2020, onde se observaram estragos já muito elevados nos frutos.

Além das diferenças genéticas que distinguem as cultivares, também existem diferenças na mesma cultivar nas distintas campanhas (Tabelas 8 e 9). Um dos compostos que importa referir para a avaliação do efeito da gafa na presença de compostos fenólicos é a vanilina. Podemos verificar que, para os anos em avaliação, há uma diminuição do teor deste composto e que tal não se relaciona, face aos resultados de outros estudos (Peres *et al.*, 2016b; Rodrigues *et al.*, 2019), com o efeito da maturação, mas pode ser um indicador a estudar para avaliar se o fungo tem alguma relação com este aldeído fenólico.

Os resultados apresentados nas Tabela 8 e 9 mostram níveis elevados de hidroxitirosol e tirosol livres encontrados nos azeites de 2019 comparados com os obtidos em 2020. Esta diferença sugere que poderá ter havido uma antecipação no processo de hidrólise dos secoiridoides presentes nas azeitonas da campanha de 2019.

Pela observação da Tabela 5, constata-se que, em 2019, os índices de maturação das primeiras colheitas em ambas as cultivares são superiores às homólogas dos anos seguintes, sugerindo que a maturação se antecipou naquele ano. Acresce que nos meses de setembro e outubro do mesmo ano, as temperaturas médias rondaram os 23 °C e os 18 °C respetivamente, com ocorrência de muito fraca precipitação. O stresse climático é considerado como um fator favorável para o aumento da síntese fenólica (Malheiro *et al.*, 2015).

Por outro lado, existem processos químicos e/ou bioquímicos relacionados com a atividade de enzimas endógenas presentes nos frutos e no azeite. As enzimas β -glicosidases possuem um papel crítico na formação do perfil fenólico do azeite, por estarem envolvidas na degradação da oleuropeína (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2015). A diminuição na atividade destas enzimas é acompanhada por uma diminuição acentuada no teor fenólico no azeite (Hbaieb *et al.*, 2015). Complementarmente às β -glicosidases (que hidrolisam glicósidos fenólicos), são assinaladas, como os principais fatores bioquímicos que afetam o conteúdo fenólico do azeite, outras enzimas endógenas oxido-redutases, como a peroxidase (PPO) e a polifenoxidase (POD) que oxidam os compostos fenólicos (Peres *et al.*, 2016b).

6.2.4. Perfil de ácidos gordos principais

Os ácidos gordos mais representativos presentes no azeite virgem são o oleico (C18:1) monoinsaturado (55-83 %), o linoleico (C18:2) polinsaturado (3,5-21 %) e os ácidos palmítico (C16:0) (7,5-0 %) e esteárico (C 18:0) (0,5-5 %) saturados (Reg. (UE) n.º 2019/1604).

Os resultados percentuais dos ácidos gordos principais obtidos nos azeites ‘Galega’ e ‘Cobrançosa’ estudados, encontram-se representados nas Tabela 10 e Tabela 11 respetivamente.

Tabela 10 - Ácidos gordos principais (%) (C18:1, C18:2, C16:0 e C18:0) por ordem de importância identificados por NIR nos azeites Galega para quatro tempos de colheita e em três anos consecutivos (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

Cultivar Campanha	Colheita	Incidência de gafa nos frutos (%)	Ácido oleico (%) C18:1	Ácido linoleico (%) C18:2	Ácido palmítico (%) C16:0	Ácido esteárico (%) C18:0
‘Galega’ 2019	T1	9	74,98 \pm 0,14	4,94 \pm 0,07	15,76 \pm 0,04	2,52 \pm 0,04
	T2	5	75,04 \pm 0,07	4,96 \pm 0,07	15,33 \pm 0,04	2,67 \pm 0,01
	T3	51	75,29 \pm 0,05	5,22 \pm 0,03	14,52 \pm 0,03	2,59 \pm 0,01
	T4	70	76,54 \pm 0,02	4,95 \pm 0,02	14,04 \pm 0,01	2,39 \pm 0,01
‘Galega’ 2020	T1	3	76,51 \pm 0,01	4,91 \pm 0,02	13,95 \pm 0,03	2,22 \pm 0,03
	T2	5	75,91 \pm 0,14	4,78 \pm 0,07	14,25 \pm 0,06	2,41 \pm 0,05
	T3	26	76,19 \pm 0,14	5,30 \pm 0,07	13,31 \pm 0,07	2,45 \pm 0,02
	T4	91	77,27 \pm 0,09	4,71 \pm 0,05	12,61 \pm 0,03	2,53 \pm 0,02
‘Galega’ 2021	T1	0	75,07 \pm 0,06	5,39 \pm 0,04	14,38 \pm 0,01	2,33 \pm 0,03
	T2	0	75,59 \pm 0,03	5,58 \pm 0,03	14,15 \pm 0,01	2,21 \pm 0,02
	T3	3	75,76 \pm 0,06	5,37 \pm 0,02	13,70 \pm 0,04	2,31 \pm 0,05
	T4	91	75,73 \pm 0,07	6,25 \pm 0,02	13,11 \pm 0,05	2,30 \pm 0,04

Para os ácidos gordos considerados (Tabela 10 e Tabela 11), constatamos que os teores avaliados nos azeites Galega e Cobrançosa se encontravam de acordo com os valores regulamentados, nas três campanhas.

Os azeites Cobrançosa, por sua vez, distinguem-se por conterem valores superiores de ácido linoleico (7 -10 %) e ácido esteárico (3 - 4 %) em relação aos azeites Galega cujos teores de C18:2 se situaram entre 4 e 6 % e os teores de C18:0 entre 2 e 3 %, respetivamente (Tabela 10 e Tabela 11).

Tabela 11 - Ácidos gordos principais (%) (C18:1, C18:2, C16:0 e C18:0) por ordem de importância identificados por NIR nos azeites Cobrançosa, para quatro tempos de colheita e em três anos consecutivos (2019, 2020 e 2021) (valores médios \pm desvio padrão).

Cultivar Campanha	Colheita	Incidência de gafa nos frutos (%)	Ácido oleico (%) C18:1	Ácido linoleico (%) C18:2	Ácido palmítico (%) C16:0	Ácido esteárico (%) C18:0
'Cobrançosa' 2019	T1	0	72,42 \pm 0,03	7,71 \pm 0,02	14,78 \pm 0,02	3,12 \pm 0,03
	T2	30	71,48 \pm 0,02	8,82 \pm 0,04	14,28 \pm 0,03	3,13 \pm 0,01
	T3	47	71,57 \pm 0,02	9,03 \pm 0,03	14,66 \pm 0,02	3,11 \pm 0,03
	T4	64	71,81 \pm 0,02	8,88 \pm 0,07	14,25 \pm 0,02	3,09 \pm 0,02
'Cobrançosa' 2020	T1	6	72,31 \pm 0,07	7,27 \pm 0,01	14,82 \pm 0,06	3,08 \pm 0,03
	T2	4	70,25 \pm 0,03	9,77 \pm 0,03	14,32 \pm 0,05	3,20 \pm 0,02
	T3	4	69,98 \pm 0,08	10,38 \pm 0,06	14,08 \pm 0,05	3,39 \pm 0,03
	T4	12	70,15 \pm 0,08	10,27 \pm 0,07	13,66 \pm 0,06	3,56 \pm 0,04
'Cobrançosa' 2021	T1	0	72,93 \pm 0,07	7,21 \pm 0,05	13,97 \pm 0,11	2,89 \pm 0,03
	T2	0	73,05 \pm 0,03	7,87 \pm 0,13	13,98 \pm 0,29	2,91 \pm 0,03
	T3	24	72,65 \pm 0,04	8,65 \pm 0,01	13,61 \pm 0,05	2,94 \pm 0,05
	T4	9	71,38 \pm 0,10	9,39 \pm 0,02	13,60 \pm 0,05	3,10 \pm 0,00

A infeção por antracnose não parece ter grandes efeitos nos principais ácidos gordos dos azeites Galega e Cobrançosa (Tabelas 10 e 11).

O aumento do teor de ácido linoleico em azeites obtidos de azeitonas infetadas por *Colletotrichum* já foi referido por outros investigadores (Peres *et al.*, 2021, Abacigil *et al.*, 2023). O aumento de ácido linoleico foi sugerido como estando associado a respostas de defesa contra agentes patogénicos (Kirsch, *et al.*, 1997).

6.2.5. Estabilidade oxidativa

Na Figura 7 onde se relacionam os valores de estabilidade oxidativa dos azeites Galega e Cobrançosa das campanhas 2020 e 2021 com os respetivos teores de fenólicos totais, facilmente se percebe que a estabilidade dos azeites segue o mesmo comportamento dos compostos fenólicos, ou seja, à medida que os fenóis totais decrescem a estabilidade oxidativa diminui, o que confirma a sua forte relação.

A Figura 7 mostra que os azeites Cobrançosa, detentores de maiores teores de compostos fenólicos, apresentam menor estabilidade oxidativa em relação aos azeites Galega, significando que outros compostos presentes no azeite estarão relacionados com este parâmetro. De facto, o principal fator que diferencia os azeites Galega dos azeites Cobrançosa é a sua composição em ácidos gordos monoinsaturados. Tal como referimos, os azeites Cobrançosa, por terem maior teor de polinsaturados, também se apresentam com maior suscetibilidade à oxidação, logo a sua estabilidade oxidativa vai ser mais baixa

relativamente aos azeites Galega. A única exceção é T4 em 2020 e 2021, devido ao efeito da gafa.

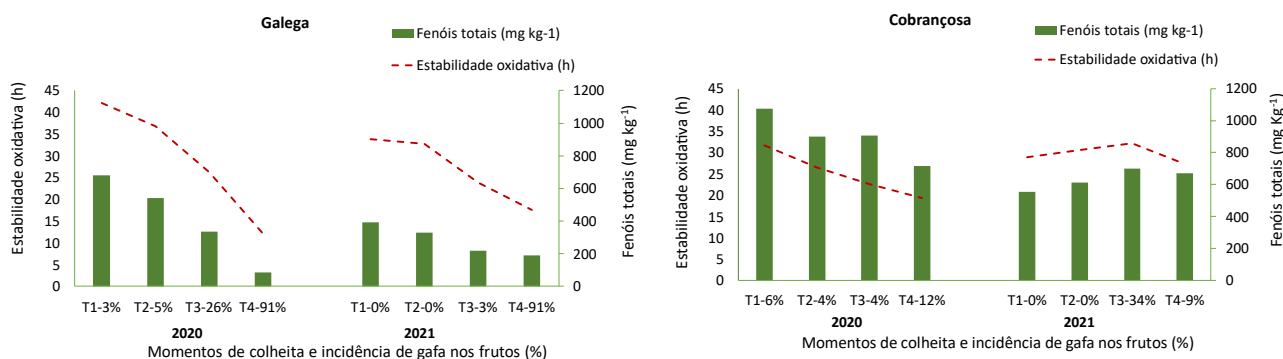


Figura 7 - Estabilidade oxidativa dos azeites Galega e Cobrançosa vs. fenóis totais avaliados em 2020 e 2021 (valores médios).

A estabilidade oxidativa foi muito diferente nos dois anos nos azeites das duas cultivares, com maior destaque para os azeites Galega de 2020, cuja estabilidade decresceu 71 %, com registos em T1 de 42 h e 680 mg kg⁻¹ de teores fenólicos totais e em T4 apenas com estabilidade de 12 h e 84 mg kg⁻¹ de fenóis totais.

Relativamente aos azeites Cobrançosa, na campanha de 2020, o azeite T1 apresentou uma estabilidade de 32 h e 1075 mg kg⁻¹ de teor fenólico, terminando em T4 com 19 h e 716 mg kg⁻¹ de teor fenólico, registando uma perda de estabilidade oxidativa de 41 %.

Em trabalhos anteriores sobre o efeito da maturação em azeitonas sãs das mesmas cultivares, verificou-se que a estabilidade oxidativa dos azeites obtidos diminui ao longo da maturação, porém com decréscimos menos acentuados (Peres *et al.*, 2016a).

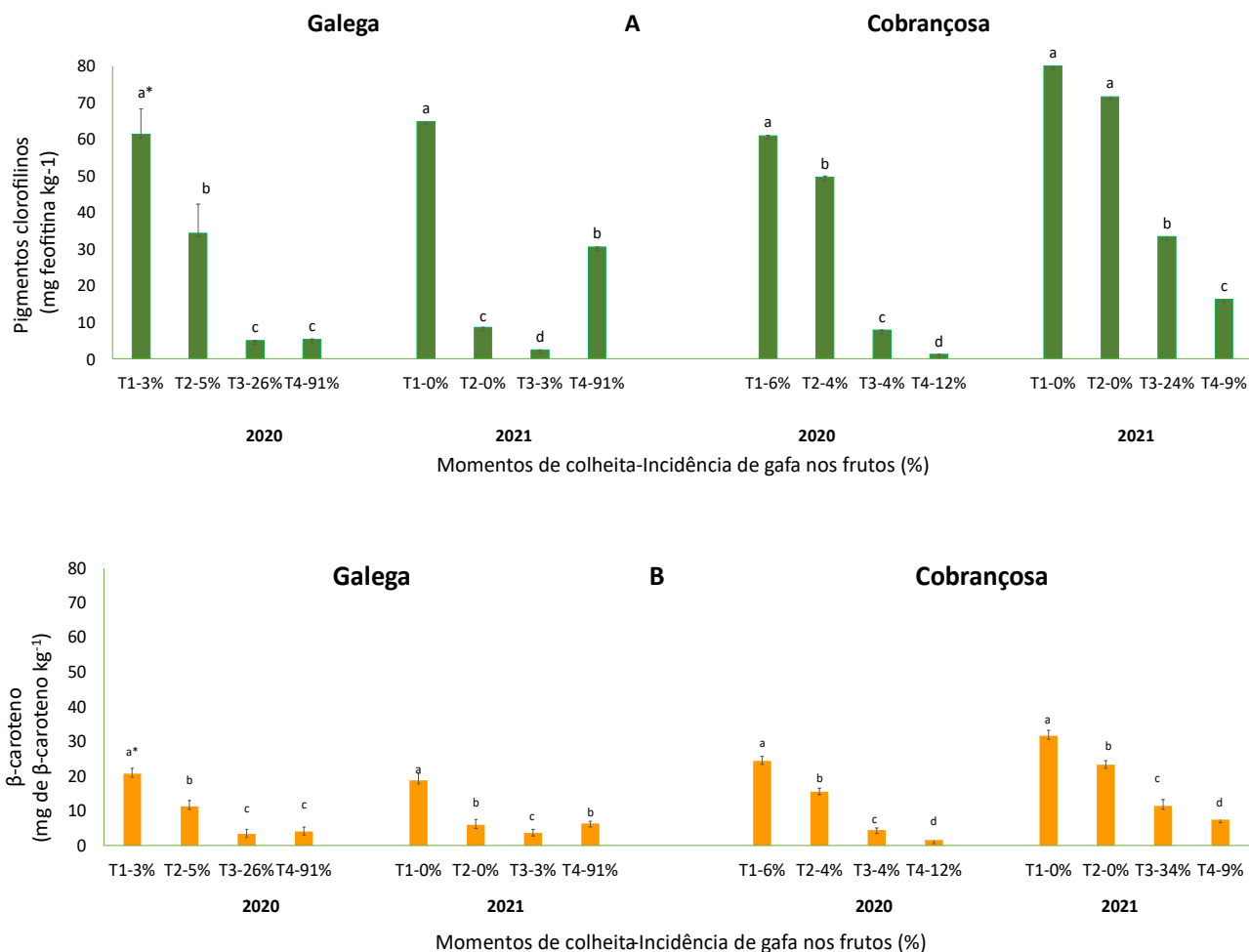
Em 2021, os azeites foram muito diferentes, quer quanto ao teor em fenóis totais, quer quanto à perda de estabilidade ao longo de toda a campanha. Neste ano, o azeite Galega (T1) iniciou com uma estabilidade de 32 h e 390 mg kg⁻¹ de concentração fenólica, e em T4 a sua estabilidade era de 19 h e continha 190 mg kg⁻¹ de compostos fenólicos, observando-se uma perda de estabilidade de 31 %. Por sua vez, o azeite Cobrançosa T1 em 2021, apresentou uma estabilidade de 29 h e 719 mg kg⁻¹ de compostos fenólicos e em T4, de 27 h e apresentava um teor fenólico de 669 mg kg⁻¹, registando-se uma perda de estabilidade nos azeites de apenas 7 % desde o início de outubro até ao final de novembro.

Os resultados refletem um decréscimo da estabilidade oxidativa nos azeites das duas cultivares, perante o aumento do índice de maturação e da presença de gafa, embora menos acentuada nos azeites 'Cobrançosa' de 2021, o que está em concordância com as menores incidências da doença e da praga verificadas naquele par ano-cultivar.

6.2.6. Pigmentos clorofilinos e β -caroteno

Os pigmentos clorofilinos e os carotenoides são responsáveis pela cor do azeite. Embora a cor não seja um parâmetro de qualidade, é um fator importante de escolha do azeite pelo consumidor. Na Figura 8 está representada a evolução dos pigmentos clorofilinos e do β -

caroteno presentes nos azeites Galega e Cobrançosa avaliados em duas (2020 e 2021) das três campanhas em estudo.



*. Letras diferentes significa que existem diferenças significativas no ano ($p \leq 0,05$).

Figura 8 - (A) Teor de pigmentos clorofilinos (mg feofitina kg⁻¹) e **(B)** teor de β-caroteno (mg β-caroteno kg⁻¹) dos azeite Galega e Cobrançosa avaliados em 2020 e 2021 (valores médios ± desvio padrão).

De um modo global, os pigmentos clorofilinos e o β-caroteno diminuem ao longo da maturação e geralmente com a maior incidência de gafa e de mosca. Porém, no azeite Galega da última colheita (T4) de 2021, onde a incidência de gafa é de 90 % verifica-se um aumento dos teores dos dois tipos de pigmentos (Figura 8) originando alteração da cor do azeite para tons alaranjados. Tal poderá dever-se a uma resposta da planta ao ataque fúngico, que promoveu a biossíntese de pigmentos como um mecanismo de defesa para prevenir a doença (Freeman & Beattie, 2008). O facto de não se ter verificado o mesmo no ano anterior para a mesma incidência de gafa, poderá estar relacionado com estado fisiológico do fruto em consequência de uma maior severidade da doença, que impossibilitou a biossíntese dos pigmentos.

Vários trabalhos publicados mostram que os pigmentos clorofilinos diminuem ao longo da maturação (Henriques *et al.*, 2001; Criado *et al.*, 2007; Matos *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2016a) assim como os resultados obtidos por Peres *et al.* (2016a), para azeites Galega e

Cobrançosa extraídos de frutos são em início de maturação, estão em consonância com os do presente trabalho. Provavelmente, o fator que mais influencia a diminuição dos pigmentos é a maturação.

6.2.7. Composição esterólica, esteróis totais e teor de eritrodiol e uvaol

O Laboratório de Estudos Técnicos (LET) do Instituto Superior de Agronomia, realizou uma análise ao perfil esterólico de amostras de azeite Galega e Cobrançosa, em dois momentos de colheita (T2 e T4 de 2020). Na Tabela 12 apresentam-se os respetivos resultados.

Tal como se pode verificar pela observação da Tabela 12, na amostra de azeite Galega T4 com 90 % de gafa, há um aumento do estigmasterol, enquanto nas restantes amostras não se verificam alterações no perfil esterólico. Além disso o teor de β -sitosterol (aparente) encontra-se muito próximo do limite legislado (≥ 93).

Tabela 12 - Composição esterólica (%), esteróis totais (mg kg^{-1}) e eritrodiol e uvaol (%) de azeites Galega e Cobrançosa (T1 e T4 de 2020).

Esteróis (%)	Galega 2020 T2	Galega 2020 T4	Cobrançosa 2020 T2	Cobrançosa 2020 T4	Limites para AVE e AV Reg. (UE) n.º 2019/1604
Colesterol	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,15 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2	\leq 0,5
Brassicasterol	\leq 0,03 (LQ)*	\leq 0,03 (LQ)	0,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,1	\leq 0,1
Campesterol	2,7 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3	2,9 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3	\leq 4,0
Estigmasterol	0,7 \pm 0,1	3,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	< campesterol
β -sitosterol(aparente)	95,9 \pm 0,8	93,5 \pm 0,8	95,3 \pm 0,8	95,3 \pm 0,8	\geq 93,0
Δ -7-estigmastenol	0,2 \pm 0,1	<0,06 (LQ)	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	\leq 0,5
Esteróis totais (mg/kg)	1443 \pm 63	1768 \pm 88	1203 \pm 60	1093 \pm 55	\geq 1000
Teor de eritrodiol e uvaol (%)	1,15 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,5	1,7 \pm 0,5	\leq 4,5

*-(LQ)-Limite de quantificação

Segundo o Regulamento (UE) n.º 2019/1604, o teor de estigmasterol deve ser inferior ao teor de campesterol para as categorias de azeite virgem extra e azeite virgem. Como se pode constatar na Tabela 12, o teor de estigmasterol na amostra de azeite Galega T4 é superior ao teor de campesterol, pelo que, o azeite Galega T4 não está conforme a legislação para azeite virgem (AV).

Nas restantes amostras, os teores de esteróis individuais estão dentro dos limites designados pela norma, apresentando valores para o β -sitosterol ≥ 93 %, para o campesterol ≤ 4 % e para o estigmasterol inferior ao de campesterol.

Verifica-se igualmente que as percentagens de eritrodiol e uvaol se encontram dentro dos valores legislados para todas as amostras analisadas (Tabela 12).

7. Conclusões

Neste trabalho estudou-se o efeito da gafa na qualidade e composição química dos azeites das cultivares 'Galega' e 'Cobrançosa' em três campanhas sucessivas, 2019, 2020 e 2021. Os resultados obtidos confirmam a maior suscetibilidade da cultivar 'Galega Vulgar' à antracnose comparativamente cv. 'Cobrançosa', especialmente quando se combinam humidade elevada e temperatura amena no outono com grande incidência de mosca-da-azeitona, o que se refletiu na grande variação da composição química dos azeites nas três campanhas em que incidiu este estudo.

Relativamente aos critérios de qualidade, apenas os azeites Galega das últimas colheitas (T4) de 2020 e de 2021 extraídos de azeitonas infetadas com maior incidência de gafa (90 %) mostraram não conformidade para as categorias AVE e AV, porque apresentaram valores de acidez elevados e notas sensoriais negativas como cheiro e sabor a mofo.

Por sua vez, os azeites Cobrançosa extraídos a partir de frutos com elevada incidência de gafa mostraram perda elevada de características sensoriais positivas associadas a esta cultivar como frutado verde, amargo e picante muito intensos, mas apresentam critérios de qualidade sempre em conformidade com a categoria AVE. Tal resulta da presença da doença nesta cultivar não conduzir a estragos tão elevados nos frutos como na cultivar 'Galega' e provavelmente ao efeito do elevado teor de fenóis destes azeites, percebidos sensorialmente como amargo e picante, poderem mascarar o defeito "mofo".

Os azeites Galega obtidos de frutos com elevada incidência de antracnose apresentaram um quase total desaparecimento de oleaceína, com conseqüente diminuição do seu valor biológico. Nos azeites Cobrançosa, quando o stresse biótico aumentou pelo aumento da incidência de gafa e mosca (2020), tal como já foi referido do ponto de vista sensorial, observou-se uma diminuição de todos os atributos positivos, correspondendo a uma diminuição da oleaceína e do oleocantal. Tanto a oleaceína como o oleocantal são compostos fenólicos altamente relacionados com os atributos positivos de amargo e picante nos azeites virgens. Assim, a presença de pragas e doenças fúngicas pode comprometer a utilização dos azeites Cobrançosa em loteamentos de azeites premiados, principalmente devido à diminuição da intensidade destes atributos.

Relativamente à alegação de saúde "Polifenóis do azeite", apenas as amostras de azeites Galega das duas primeiras colheitas de 2019 cumprem esta alegação, provavelmente devido a uma menor gravidade da doença. Em contrapartida, os azeites Cobrançosa, ao longo da maturação e independentemente da percentagem da incidência de gafa e mosca-da-azeitona, mantiveram sempre o teor de hidroxitirosol e seus derivados superior ao valor mínimo, nas três campanhas, o que permite a utilização da alegação de saúde no rótulo.

No azeite Galega T4 de 2021, verificou-se um aumento significativo de pigmentos clorofilinos e de β - caroteno associado à elevada percentagem de gafa (90 %), originando alteração da cor do azeite para tons alaranjados. Para esclarecer e entender a dinâmica do binómio "agente patogénico-cor do azeite", devem ser desenvolvidos trabalhos futuros que estudem esta temática.

Salienta-se que as condições agroclimáticas da região de Castelo Branco são muito favoráveis ao desenvolvimento da gafa pelo que é necessário monitorizar a doença e integrar estratégias de gestão para combater a doença. Entre estas estratégias, após a

escolha da cultivar e do compasso de plantação, outras medidas de gestão do olival são necessárias como a definição do momento da colheita.

É de destacar também que estes resultados foram obtidos em azeites extraídos laboratorialmente em condições controladas de tempo e temperatura e imediatamente após a colheita dos frutos, pelo que, não há influência do tempo de armazenamento das azeitonas como se pode verificar em condições industriais.

Em Portugal, devido à dificuldade em sincronizar a colheita dos frutos e a extração do azeite no lagar, o olivicultor ou o próprio lagar são obrigados muitas vezes a armazenar os frutos por períodos de vários dias. Os períodos de pós-colheita dos frutos agravam a depreciação da sua qualidade devido à rápida disseminação do fungo, pelo que se devem reforçar as recomendações do Código de Boas Práticas, para limitar o tempo de armazenamento dos frutos.

Mais uma vez se reforça a necessidade da antecipação da data de colheita da azeitona sobretudo em olivais em modo de produção biológica e a necessidade de uma boa sincronização com o lagar para a extração do azeite.

Referências

- Abacigil, T. Ö., Kıralan, M., & Ramadan, M. F. (2023). Quality parameters of olive oils at different ripening periods as affected by olive fruit fly infestation and olive anthracnose. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 1-9.
- Al-Bachir, M., & Sahloul, H. (2017). Fatty acid profile of olive oil extracted from irradiated and non-irradiated olive fruits. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2550-2558.
- Alkan, N., Fluhr, R., Sherman, A., & Prusky, D. (2008). Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8), 1058-1066.
- Almeida, J. V. D. (1899). La gaffa des olives en Portugal. *Bulletin de la Société Mycologique de France, Tome XV, fasc. 2, 1899, p. 90.*
- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49-73.
- Andrewes, P., Busch, J. L., de Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1415-1420.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31.
- Aparício, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 614-62. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<614::AID-EJLT614>3.0.CO;2-L)
- Ardi, R., Kobiler, I., Jacoby, B., Keen, N. T., & Prusky, D. (1998). Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(5-6), 269-285.
- Auyong, A. S. M., Ford, R., & Taylor, P. W. J. (2012). Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 372-382.
- Báidez, A. G., Gómez, P., Del Río, J. A., & Ortuño, A. (2006). Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4-6), 224-229.
- Bailey, J. A., O'connell, R. J., Pring, R. J., & Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* species. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (ed. J. A. Bailey & M. J. Jeger), C.A.B. International: Wallingford, U.K. 88-120.
- Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., & De Tejada, M. L. S. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328-336.
- Barranco, N., D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo R., L., Touzani, A., Castañeda, C., & Trujillo N., I. (2000). Catálogo mundial de variedades de olivo. Disponible em: <https://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/20.500.13082/147917>.
- Beauchamp, G., Keast, R., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C., Smith, A., & Breslin, P. (2005). Phytochemistry: Ibuprofen-like activity. in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437, (7055), 45-46.

- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and molecular plant pathology*, 57(3), 101-110.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Food Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8), 1679-1719.
- Bhadauria, V., Banniza, S., Wang, L. X., Wei, Y. D., & Peng, Y. L. (2010). Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 81-95.
- Bompeix, G., & Julio, E. V. R. (1988). *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et V. Schrenk In: European Handbook of Plant Diseases (Smith IM, Dunez J., Lelliot RA, Phillips DH and Archer SA, eds).
- Borkou, G., & Gabbay, J. (2009). Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Current Chemical Biology*, 3(3), 272-278
- Boskou, D. (2006). Olive oil: chemistry and technology. Ed. D. Boskou. 2nd. Edition. AOCS Publishing.
- Boskou, D. (2011). Olive oil. Vegetable oils in food technology. Composition, properties and uses. Editor(s): F. D. Gunstone. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In Olive oil. D. Boskou editor. AOCS press (pp. 41-72).
- Braga, R. & Pinto, P. A. (2009). Alterações climáticas e agricultura. *Inov. Tecnol. Form. Agríc*, 12, 34-56.
- Bueno, A. M., & Jones, O. (2002). Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin*, 25(9), 147-156.
- Cacciola, S. O., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G. E., Schena, L., Frisullo, S., & di San Lio, G. M. (2012). Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 29-44.
- Carvalho, M. T., Simões-Lopes, P., & Monteiro da Silva, M. J. (2008). Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. *Acta Horticulturae* (791), 555-558.
- Casas, A. T., Castillo, L. F. R., Moral, J. M., Escudero, F. J. L., & López, M. A. B. (2009). Enfermedades del olivo. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, (209), 18-28.
- Cerretani, L., Bendini, A., Rotondi, A., Lercker, G., & Toschi, T. G. (2005). Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(2), 93-100.
- Chattaoui, M., Raya, M. C., Bouri, M., Moral, J., Perez-Rodriguez, M., Trapero, A., & Rhouma, A. (2016). Characterization of a *Colletotrichum* population causing anthracnose disease on Olive in northern Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1368-1381.
- Clodoveo, M. L., Delcuratolo, D., Gomes, T., & Colelli, G. (2007). Effect of different temperatures and storage atmospheres on Coratina olive oil quality. *Food Chemistry*, 102(3), 571-576.
- COI (2017) International Olive Council Method for Determination of Biophenols in Olive Oils by HPLC. COI/T20/Doc.No 29/2017. Disponível em: <http://www.https://www.internationaloliveoil.org/>.
- COI (2018). Sensory Analysis of Olive Oil. Method for the Organoleptic Assessment of Virgin Olive Oil. COI/T.20/DOC.15/Rev.10. Disponível em: <http://www.https://www.internationaloliveoil.org/>.

COI. (2011). International Olive Council Guide for the Determination of the Characteristics of Oil-Olives. COI/OH/Doc. No 1/2011. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/>.

Conde, P., Villamil, J. J., Fredes, A., Bruzzone, J., Martínez, C., Montelongo, M. J., Ellis, A. C., Gámbaro, A. & Leoni, C. (2013a). Determinación del umbral máximo tolerable de fruta infectada por *Colletotrichum* spp. para la obtención de aceite de oliva extra virgen. In *Jornada de Divulgación Resultados experimentales en el cultivo de olivos*. INIA Serie Actividades de Difusión N° 721 (pp. 31-37).

Conde, P., Montelongo, M. J., & Leoni, C. (2013b). Enfermedades del olivo. In: *Aceite de oliva: de la planta al consumidor*, M. Grompone y J. Villamil. Editorial Hemisferio Sur e INIA. Uruguay. (1), 183-214.

Costa, D., Fernandes, T., Martins, F., Pereira, J. A., Tavares, R. M., Santos, P. M., Batista, P., & Lino-Neto, T. (2021). Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research*, 245, 126693.

Criado, M. N., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2007). Effect of the technological and agronomical factors on pigment transfer during olive oil extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5681–5688.

Da Silva, F. C. V. (2016). *Olive anthracnose: passive defense of tolerant and susceptible Portuguese Olea europaea L. cultivars and its effect on olive oil quality*. Escola Superior Agrária de Bragança Tese de Mestrado, Bragança.

De Bona, G. S., Vincenzi, S., De Marchi, F., Angelini, E., & Bertazzon, N. (2021). Chitosan induces delayed grapevine defense mechanisms and protects grapevine against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(3), 715-724.

De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155-168.

Del Río, J. A., Báidez, A. G., Botía, J. M., & Ortuno, A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, 83(1), 75-78.

Delgado, L., García-Guzmán, G., & Heil, M. (2013). Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits?. *Fungal Diversity*, 60(1), 125-135.

Diarte, C., Iglesias, A., Graell, J., & Lara, I. (2023). Fruit Cuticle Composition in ‘Arbequina’Olive: Time-Course Changes along On-Tree Ripening under Irrigated and Rain-Fed Conditions. *Horticulturae*, 9(3), 394.

Diarte, C., Lai, P. H., Huang, H., Romero, A., Casero, T., Gatiús, F., & Lara, I. (2019). Insights into olive fruit surface functions: a comparison of cuticular composition, water permeability, and surface topography in nine cultivars during maturation. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1484.

Diéguez-Urbeondo, J., Förster, H., Soto-Estrada, A., & Adaskaveg, J. E. (2005). Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*, 95(7), 751-758.

Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), EFSA *Journal*. 9(4), 2033.

Freeman, B., & Beattie, G. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Health Instructor*. 149. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0226-01>

Freire, F. C. O., Cardoso, J. E., Dos Santos, A. A., & Viana, F. M. P. (2002). Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protection*, 21(6), 489-494.

- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2015). Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 171, 364-369.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78(2), 207-211.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Gomes, S., Bacelar, E., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., & Guedes-Pinto, H. (2012). Infection process of olive fruits by *Colletotrichum acutatum* and the protective role of the cuticle and epidermis. *Journal of Agricultural Science*, 4(2), 101.
- Gomes, S., Prieto, P., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Martin, A., & Guedes-Pinto, H. (2009). Development of *Colletotrichum acutatum* on tolerant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: a microscopic analysis. *Mycopathologia*, 168, 203-211.
- Gouveia, C., Ferreira-Dias S., Vitorino C., Oliveira H., Peres, F. (2022). Influence of olive anthracnose and olive fruit fly on bioactive compounds of Cobrançosa olive oils. *XVI Encontro de Química dos Alimentos*. 23-26 de Outubro de 2022, Castelo Branco.
- Gouveia, C. (2019). *Alegações de Saúde em Azeite de Montanha*. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Relatório de fim de curso de licenciatura em Biotecnologia Alimentar. Castelo Branco.
- Gouveia, C.; Salgueiro, C.; Peres, F. (2019). "Importância do Exame Organoléptico do Azeite Virgem e a Melhoria Sensorial dos Azeites de Montanha." In *Desenvolvimento e Inovação de um Produto Endógeno*. O caso dos Azeites de Montanha., 76-90.
- Gouvinhas, I., Machado, N., Gironés-Vilaplana, A., Gomes, S., Carvalho, T., Domínguez-Perles, R., & Barros, A. I. (2016). Sorting out the value of spectroscopic tools to assess the *Colletotrichum acutatum* impact in olive cultivars with different susceptibilities. *Journal of Chemometrics*, 30(9), 548-558.
- Gouvinhas, I., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Barros, A., & Gomes, S. (2019). Impact of *Colletotrichum acutatum* pathogen on olive phenylpropanoid metabolism. *Agriculture*, 9(8), 173.
- Guest, D. & Brown, J. (1997). Plant defences against pathogens. *Plant pathogens and plant diseases*, 263, 286.
- Guestsky, R., Kobilier, I., Ávila-Quezada, G., & Prusky, D. (2007). Metabolism of epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides*. In *Book of Abstracts of the VI World Avocado Congress* (pp. 12-16).
- Guidarelli, M., Carbone, F., Mourgues, F., Perrotta, G., Rosati, C., Bertolini, P., & Baraldi, E. (2011). *Colletotrichum acutatum* interactions with unripe and ripe strawberry fruits and differential responses at histological and transcriptional levels. *Plant Pathology*, 60(4), 685-697.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1991). Tannins and lignins. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, 1, 355-388.
- Hbaieb, R. H., Kotti, F., García-Rodríguez, R., Gargouri, M., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2015). Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles. *Food Chemistry*, 174, 240-247.
- Henriques, L. R., Conceição, A. C., Peres, M. F., & Pinheiro-Alves, M. C. (2001). β -caroteno e pigmentos clorofilinos em azeites monovarietais da Beira Baixa, campanha 1998/99 *Revista das Ciências Agrárias*, 199-204.
- Houshia, O. J., AbuEid, M., Zais, O.; Shqair, H., Zaid, M., Nashariti, W., Noor, B. & Al-Rimwai, F. (2019). Alteration of Nabali Baladi Extra Virgin Olive Oil (EVOO) chemical parameters as a function of air sunlight exposure. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 26(38), 1-10.

Hrazdina, G., & Wagner, G. J. (1985). Compartmentation of plant phenolic compounds; sites of synthesis and accumulation. *Biochemistry of plant phenolics/edited by CF van Sumere and PJ Lea*.

Iannotta, N., Perri, E., Sirianni, R., & Tocci, C. (1999). Influence of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) and *Camarosporium dalmatica* (Thum) attacks on olive oil quality, *Acta Horticulturae* (474), 573-576.

IPMA- Instituto português do mar e da atmosfera. Disponível em: www.ipma.pt, acessado em 9-04-2023.

Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. (2013). From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Medica*, 79(16), 1576-1587.

King, W. T., Madden, L. V., Ellis, M. A., & Wilson, L. L. (1997). Effects of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* spp. infecting strawberry fruit. *Plant Disease*, 81(1), 77-84.

Kirsch, C., Hahlbrock, K., & Somssich, I. E. (1997). Rapid and transient induction of a parsley microsomal delta 12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant physiology*, 115(1), 283-289.

Kishimoto, N. (2018). Identification of specific odour markers in oil from diseased olive fruits using an electronic nose. *Chemical engineering transactions*, 68, 301-306.

Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant-microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?. *Microbiological research*, 207, 41-52.

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.

Lee, S., Hong, J. C., Jeon, W. B., Chung, Y. S., Sung, S., Choi, D., & Oh, B. J. (2009). The salicylic acid-induced protection of non-climacteric unripe pepper fruit against *Colletotrichum gloeosporioides* is similar to the resistance of ripe fruit. *Plant cell reports*, 28, 1573-1580.

Leoni, C., Bruzzone, J., Villamil, J. J., Martínez, C., Montelongo, M. J., Bentancur, O., & Conde-Innamorato, P. (2018). Percentage of anthracnose (*Colletotrichum acutatum* s.s.) acceptable in olives for the production of extra virgin olive oil. *Crop protection*, 108, 47-53.

Loureiro, A., Talhinhos, P., & Oliveira, H. (2018). A gafa da oliveira é causada por fungos de diversas espécies, com distinta distribuição geográfica, virulência e preferência pela cultivar. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(spe), 102-109.

Machowetz, A., Poulsen, H. E., Gruendel, S., Weimann, A., Fitó, M., Marrugat, J., de la Torre, R., Salonen, J. T., M. I., & Koebnick, C. (2007). Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *The FASEB Journal*, 21(1), 45-52.

Mafra, I., Lanza, B., Reis, A., Marsilio, V., Campestre, C., De Angelis, M., & Coimbra, M. A. (2001). Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiologia plantarum*, 111(4), 439-447.

Malacrinò, A., Schena, L., Campolo, O., Laudani, F., & Palmeri, V. (2015). Molecular analysis of the fungal microbiome associated with the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Fungal Ecology*, 18, 67-74.

Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 226-242.

Marcell, L. M., & Beattie, G. A. (2002). Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(12), 1236-1244.

Markakis, E. A., Roditakis, E. N., Kalantzakis, G. S., Chatzaki, A., Soultatos, S. K., Stavrakaki, M., & Goumas, D. E. (2021). Characterization of fungi associated with olive fruit rot and olive oil degradation in Crete, southern Greece. *Plant Disease*, 105(11), 3623-3635.

- Martín, M. P., & García-Figueres, F. (1999). *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 733-741.
- Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., & Homolka, L. (2016). Biodegradation of phenolic compounds by *Basidiomycota* and its phenol oxidases: a review. *Chemosphere*, 149, 373-382.
- Mastralexi, A., Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2014). Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC Regulation 432/2012). *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(12), 2459-2461.
- Mateo-Sagasta, E. (1968). Estudios básicos sobre *Gloeosporium olivarum* Alm. (deuteromiceto melanconial). *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric*, 30, 31-135.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & Félix, M. D. R. (2018). Diversity of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose and new perspectives on controlling the disease in Portugal. *Agronomy*, 8(12), 301.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Campos, M. D., Rei, F., & do Rosário Félix, M. (2019). Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology*, 123(1), 66-76.
- Matos, L. C., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Oliveira, M. B. P. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*, 102(3), 976-983.
- Mendonça, E., Martins, A., & Anselmo, A. M. (2004). Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(1), 38-46.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Jakopic, J., Cunja, V., Veberic, R., Munda, A., & Stampar, F. (2013). Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. *Physiological and molecular plant pathology*, 84, 138-145.
- Miles, T. D., Hancock, J. F., Callow, P., & Schilder, A. M. C. (2012). Evaluation of screening methods and fruit composition in relation to anthracnose fruit rot resistance in blueberries. *Plant Pathology*, 61(3), 555-566.
- Miles, T. D., Wharton, P. S., & Schilder, A. C. (2008). Cytological and chemical evidence for an active resistance response to infection by *Colletotrichum acutatum* in 'Elliott' blueberries. In IX *International Vaccinium Symposium*, 810, 361-368.
- Mina, D., Pereira, J. A., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2020). Epiphytic and endophytic bacteria on olive tree phyllosphere: exploring tissue and cultivar effect. *Microbial Ecology*, 80, 145-157.
- Mincione, A., Valenzise, M., Runcio, A., Poiana, M., Agosteo, G. E., & Taccone, P. L. (2004). Ricerche sugli oli di oliva vergini calabresi. Influenza delle fitopatie sulle caratteristiche qualitative degli oli. Nota I: Effetti diretti degli attacchi di Antracnosi. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 81(1), 9-17.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., & Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(3), 192-196.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Hornero-Méndez, D., & Pérez-Gálvez, A. (2008). Carotenoids and provitamin A in functional foods. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (pp. 277-336). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Molina-Garcia, L., Santos, C. S. P., Cunha, S. C., Casal, S., & Fernandes, J. O. (2017). Comparative fingerprint changes of toxic volatiles in low PUFA vegetable oils under deep-frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(2), 271-284.
- Mongkolporn, O., Montri, P., Supakaew, T., & Taylor, P. W. (2010). Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*, 94(3), 306-310.

- Montag, J., Schreiber, L., & Schönherr, J. (2006). An in vitro study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 474-481.
- Montedoro, G., Baldioli, M., Selvaggini, R., Begliomini, A. L., Taticchi, A., & Servili, M. (2000, September). Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: The importance of the endogenous enzymes. In *IV International Symposium on Olive Growing*, 586, 551-556.
- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79.
- Montri, P., Taylor, P. W. J., & Mongkolporn, O. (2009). Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. *Plant Disease*, 93(1), 17-20.
- Moral, J., Bouhmidi, K. & Trapero, A. (2008). Influence of fruit maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease*, 92(10), 1421-1426.
- Moral, J., de Oliveira, R. & Trapero, A. (2009). Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 99(5), 548-556.
- Moral, J. & Trapero, A. (2009). Assessing the susceptibility of olive cultivars to anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 93(10), 1028-1036.
- Moral, J. & Trapero, A. (2012). Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology*, 102(10), 982-989.
- Moral, J., Jurado-Bello, J., Sánchez, M. I., de Oliveira, R. & Trapero, A. (2012). Effect of temperature, wetness duration, and planting density on olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology*, 102(10), 974-981.
- Moral, J., Xaviér, C., Roca, L. F., Romero, J., Moreda, W. & Trapero, A. (2014). La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite. *Grasas y Aceites*, 65(2), e028.
- Moral, J., Alsalimiya, M., Roca, L. F., Díez, C. M., León, L., De la Rosa, R. & Trapero, A. (2015). Relative susceptibility of new olive cultivars to *Spilocaea oleagina*, *Colletotrichum acutatum*, and *Pseudocercospora cladosporioides*. *Plant disease*, 99(1), 58-64.
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., de Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F. & Trapero, A. (2018). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection*, 114, 167-176.
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Raya, M. C., Jurado-Bello, J., López-Moral, A., Roca, L. F. & Trapero, A. (2021). Diversity of *Colletotrichum* Species associated with olive anthracnose worldwide. *Journal of Fungi*, 7(9), 741.
- Mosca, S., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola, S. O. & Schena, L. (2014). Molecular analysis of *Colletotrichum* species in the carposphere and phyllosphere of olive. *PLoS One*, 9(12), e114031.
- Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M. & Katzogiannos, E. (2004). Analysis of minor components in olive oil. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 61(1-2), 155-160.
- Nenadis, N., Mastralexi, A., Tsimidou, M. Z., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Donarski, J. & Gallina Toschi, T. (2018). Toward a harmonized and standardized protocol for the determination of total hydroxytyrosol (Htyr) and tyrosol (Tyr) content in virgin olive oil. Extraction solvent. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2018, vol. 120, num. 11, p. 1800099.
- Newton, A. C., Gravouil, C. & Fountaine, J. M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157(3), 343-359.

- Nicholson, R. L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 369-389.
- Norma portuguesa (NP) 896, 1986. Gorduras e óleos comestíveis. Preparação das amostras para laboratório.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S. & Robards, K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, 25(6), 1167-1179.
- O'Connell, R. J., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J. & Green, J. (2000). Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. *Colletotrichum*, 57-76.
- Parker, D., Beckmann, M., Zubair, H., Enot, D. P., Caracuel-Rios, Z., Overy, D. P. & Draper, J. (2009). Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal*, 59(5), 723-737.
- Parvez, M. M., Tomita-Yokotani, K., Fujii, Y., Konishi, T. & Iwashina, T. (2004). Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(7), 631-635.
- Pascholati, S. F. & Leite, B. (1995). Hospedeiro: mecanismos de resistência. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*.
- Peres, F., Martins, L. L., Mourato, M., Vitorino, C., Antunes, P. & Ferreira-Dias, S. (2016a). Phenolic compounds of 'Galega' 'Vulgar' and 'Cobrançosa' olive oils along early ripening stages. *Food Chemistry*, 211, 51-58.
- Peres, F., Martins, L. L. & Ferreira-Dias, S. (2016b). Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14) 3104-3126.
- Peres, F., Talhinhos, P., Afonso, H., Alegre, H., Oliveira, H. & Ferreira-Dias, S. (2021). Olive oils from fruits infected with different anthracnose pathogens show sensory defects earlier than chemical degradation. *Agronomy*, 11(6), 1041.
- Pérez, M. (2011). Evaluación en campo de fungicidas, sales de calcio y extractos vegetales para el control de la antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. Trabajo Profesional Fin de Máster, ETSIAM, Córdoba.
- Peri, C. (Ed.). (2014). *The extra-virgin olive oil handbook*. John Wiley & Sons.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M. & Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1191-1196.
- Podila, G. K., Rogers, L. M. & Kolattukudy, P. E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology*, 103(1), 267-272.
- Pokorny, J., Kalinova, L. & Dysseler, P. (1995). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils: Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1781-1787.
- Procida, G., Cichelli, A., Lagazio, C. & Conte, L. S. (2016). Relationships between volatile compounds and sensory characteristics in virgin olive oil by analytical and chemometric approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 311-318.
- Prusky, D., Koblier, I., Ardi, R., Beno-Moalem, D., Yakoby, N. & Keen, N. (2000). Resistance mechanisms of subtropical fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*, 232-244.

- Prusky, D., McEvoy, J. L., Leverentz, B. & Conway, W. S. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(9), 1105-1113.
- Purcaro, G., Codony, R., Pizzale, L., Mariani, C., & Conte, L. (2014). Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(7), 805-811.
- Rallo, L. (2005). *Variedades de olivo en España*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia horticulturae*, 233, 491-509.
- Ramos-Escudero, F., Morales, M. T., & Asuero, A. G. (2015). Characterization of bioactive compounds from monovarietal virgin olive oils: Relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *International Journal of Food Properties*, 18(2), 348-358.
- Reboredo-Rodríguez, P., Olmo-García, L., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Carrasco-Pancorbo, A., & Cancho-Grande, B. (2020). Effect of olive ripening degree on the antidiabetic potential of biophenols-rich extracts of 'Brava Gallega virgin olive oils. *Food Research International*, 137, 109427.
- Reboredo-Rodríguez, P., Valli, E., Bendini, A., Di Lecce, G., Simal-Gándara, J., & Gallina Toschi, T. (2016). A widely used spectrophotometric assay to quantify olive oil biophenols according to the health claim (EU Reg. 432/2012). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(10), 1593-1599.
- Regulamento (UE) n.º 432/2012 da comissão de 16 de maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças. *Jornal Oficial da União Europeia: Bruxelas, Bélgica, 2012; Volume L 136*.
- Regulamento de Execução (UE) n.º 2019/1604 da Comissão de 27 de setembro de 2019 que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia: Bruxelas, Bélgica, 2019; Volume L 250/14*.
- Reina-Pinto, J. J. & Yephremov, A. (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 540-549.
- Roca, L. F., Moral, J., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., & Trapero, A. (2007). Copper fungicides in the control of olive diseases. *Olea*, 26, 48-50.
- Roca, M., Pastor, S. E., & Bernanrdi Lima, N. (2019). "Antracnosis" o "Aceituna Jabonosa" o "Lepra". Consejo Federal de Inversiones. Provincia de la Rioja.España. 187-210.
- Rodrigues, N., Casal, S., Pinho, T., Peres, A. M., Bento, A., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2019). Ancient olive trees as a source of olive oils rich in phenolic compounds. *Food chemistry*, 276, 231-239.
- Romero, J., Santa-Bárbara, A. E., Moral, J., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F., & Trapero, A. (2022). Effect of latent and symptomatic infections by *Colletotrichum godetiae* on oil quality. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 545-556.
- Roy, S., Nuckles, E., & Archbold, D. D. (2018). Effects of phenolic compounds on growth of *Colletotrichum* spp. in vitro. *Current microbiology*, 75, 550-556.
- Runcio, A., Sorgonà, L., Mincione, A., Santacaterina, S., & Poiana, M. (2008). Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria.: Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. *Food Chemistry*, 106(2), 735-740.
- Saillard, M. (2014). Les effets «santé» de l'huile d'olive. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 21(5), 1-5.
- Salotti, I., Ji, T., & Rossi, V. (2022). Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades. *Frontiers in Plant Science*, 13.

- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S. O., Faedda, R., Sanzani, S. M., Agosteo, G. E. & Magnano di San Lio, G. (2014). Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology*, 63(2), 437-446.
- Sergeeva, V. (2011). Disease resistance and adaptability of olive cultivars. Australia and. New Zealand. in Olive diseases and disorders. (Editors: Schena L., Agosteo G.E., Cacciola S.O) Publisher: Transworld Research Network. Kerala, India 357-377.
- Sergeeva, V. & Spooner-Hart, R. (2010). Diseases and disorders associated with environmental stress in sustainable olive orchards in Australia. In *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): Olive Trends Symposium-From the 924*, 145-150.
- Servili, M. (2014). The phenolic compounds: a commercial argument in the economic war to come on the quality of olive oil?. *Ocl journal*. 21(5), D509.
- Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F. & Montedoro, G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17, 76-84.
- Sousa, A., Pereira, J. A., Casal, S., Oliveira, B. & Bento, A. (2005). Effect of the olive fruit fly and the olive anthracnose on oil quality of some Portuguese cultivars. 2st European meeting of the IOBC/WPRS study group "Integrated Control in Olives", "Integrated Protection of olive Crops".
- Stergiopoulos, I. & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, 233-263.
- Stergiopoulos, I., & Gordon, T. R. (2014). Cryptic fungal infections: the hidden agenda of plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 506.
- Talhinhas, P., Gonçalves, E., Sreenivasaprasad, S. & Oliveira, H. (2015). Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 73-83.
- Talhinhas, P., Loureiro, A. & Oliveira, H. (2018). Olive anthracnose: a yield-and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1797-1807.
- Talhinhas, P., Mota-Capitão, C., Martins, S., Ramos, A. P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimarães, L. & Oliveira, H. (2011). Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology*, 60(3), 483-495.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. & Oliveira, H. (2005). Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2987-2998.
- Trapero, A. & Blanco, M. A. (2004). Enfermedades. In: El cultivo de olivo. D. Barranco, R. Fernández-Escobar, L. Rallo, eds. Coedición Junta de Andalucía. Mundi-Prensa, Madrid, 557-614.
- Tsimidou, M. Z., Sotiropoulou, M., Mastralexi, A., Nenadis, N., García-González, D. L. & Gallina Toschi, T. (2019). In house validated UHPLC protocol for the determination of the total hydroxytyrosol and tyrosol content in virgin olive oil fit for the purpose of the health claim introduced by the EC Regulation 432/2012 for "Olive Oil Polyphenols". *Molecules*, 24(6), 1044.
- Velázquez-Palmero, D., Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Hernández, M. L., Vaistij, F. E., Graham, I. A. & Martínez-Rivas, J. M. (2017). An oleuropein β -glucosidase from olive fruit is involved in determining the phenolic composition of virgin olive oil. *Frontiers in plant science*, 8, 1902.
- Veloso, J. S., Lima, W. G., Reis, A., Doyle, V. P., Michereff, S. J. & Câmara, M. P. (2021). Factors influencing biological traits and aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with cashew anthracnose in Brazil. *Plant Pathology*, 70(1), 167-180.

- Verma, N., MacDonald, L. & Punja, Z. K. (2007). Environmental and host requirements for field infection of blueberry fruits by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia. *Plant Pathology*, 56(1), 107-113.
- Visioli, F., Poli, A. & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*, 22(1), 65-75.
- Wan, J., He, M., Hou, Q., Zou, L., Yang, Y., Wei, Y. & Chen, X. (2021). Cell wall associated immunity in plants. *Stress Biology*, 1(1), 3.
- Wang, N., Ma, T., Yu, X., Xu, L., & Zhang, R. (2016). Determination of peroxide values of edible oils by ultraviolet spectrometric method. *Food Analytical Methods*, 9, 1412-1417.
- Wharton, P. S., & Diéguez-Uribeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. In *Anales del jardín botánico de Madrid*, 61(1), 3-22.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current opinion in plant biology*, 5(4), 300-307.
- Xaviér, C. J. (2009). Resistencia y grupos de virulencia en la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. (Master Thesis, Universidad de Córdoba, Córdoba).
- Xavier, C. J. (2015). Resistencia y control químico en la Antracnosis del olivo causada por *Colletotrichum* spp. (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba, Córdoba).
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1), 10.