



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Relação da antracnose da oliveira ("Colletotrichum" spp.)
com as características do azeite.**

Tiago Alexandre Palma Silva

Orientador(es) | Maria do Rosário Félix
Justino António Ventura Sobreiro

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Relação da antracnose da oliveira ("Colletotrichum" spp.)
com as características do azeite.**

Tiago Alexandre Palma Silva

Orientador(es) | Maria do Rosário Félix
Justino António Ventura Sobreiro

Évora 2025



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Justino António Ventura Sobreiro (Instituto Politécnico de Beja) (Orientador)
Raquel Marta Garcia (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

Começo por deixar uma palavra de profundo agradecimento aos meus orientadores, professor Justino António Ventura Sobreiro e a professora Maria Rosário Félix pelo apoio constante, pela disponibilidade demonstrada e pelo valioso conhecimento que me transmitiram ao longo da realização desta dissertação. A vossa orientação foi essencial para o meu desenvolvimento académico e para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, deixo o meu maior reconhecimento e gratidão, pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos mais exigentes e pela motivação constante que sempre me transmitiram. Este percurso só foi possível graças à vossa força e dedicação.

Aos meus amigos, agradeço pela amizade, pelo incentivo e pela presença em todos os momentos, tornando esta etapa mais leve e enriquecedora.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação, deixo o meu sincero agradecimento.

Resumo

A antracnose da oliveira (*Colletotrichum* spp.) é uma das principais doenças que afetam a olivicultura mediterrânea, provocando perdas significativas de produção e comprometendo a qualidade do azeite. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto da doença nas características físico-químicas do azeite e identificar os fatores ambientais e agronômicos que favorecem a sua ocorrência. O trabalho foi realizado em pomares da variedade Arbequina na região do Alentejo, através de amostragens sequenciais de frutos durante a campanha de 2024. Foram analisados parâmetros como teor de água, rendimento em óleo e acidez, relacionando-os com a incidência de antracnose, a presença da mosca-da-azeitona e as condições meteorológicas. Os resultados evidenciam uma correlação positiva entre a severidade da doença e o aumento da acidez do azeite, bem como a influência de períodos húmidos e temperaturas moderadas na intensificação das infeções.

Palavras-Chave: Fitotecnia; Gafa; Olival; Azeitona; Colheita

Relationship between olive anthracnose (*Colletotrichum* spp.) and olive oil composition

Abstract

Olive anthracnose (*Colletotrichum* spp.) is one of the most damaging diseases in Mediterranean olive cultivation, significantly reducing yield and olive oil quality. This study aimed to evaluate the impact of anthracnose on olive oil physicochemical properties and identify the environmental and agronomic factors promoting its incidence. Field trials were conducted in Arbequina olive orchards in the Alentejo region, with sequential fruit sampling during the 2024 season. Parameters such as moisture content, oil yield, and acidity were analyzed in relation to anthracnose incidence, olive fruit fly damage, and climatic conditions. Results revealed a positive correlation between disease severity and increased oil acidity, highlighting the role of humid periods and moderate temperatures in disease progression.

Keywords: Crop Science; Olive mill; Olive grove; Olive; Harvest.

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de quadros.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Estado da arte.....	4
2.1. A oliveira	5
2.2. Antracnose ou gafa da oliveira	6
2.3. Etiologia e taxonomia.....	6
2.4. Ciclo de Vida e Epidemiologia de <i>Colletotrichum</i> spp. na Oliveira	7
2.5. Relação com o clima.....	11
2.6. Controlo da doença.....	12
2.7. Mosca da azeitona	13
2.7.1. Relação da mosca com a antracnose	15
2.8. Como é afetada a qualidade do azeite pela antracnose.....	16
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Caracterização da exploração	20
3.1.1. Localização das parcelas	20
3.1.2. Caracterização climática.....	22
3.2. Delineamento do ensaio.....	22
3.2.1. Em campo	22
3.2.1. Em laboratório	24
3.3. Avaliação dos Parâmetros do Azeite	24
3.3.1. Métodos de Análise Laboratorial da Azeitona: Teor de água, óleo e acidez.....	24
4. Resultados.....	30
4.1. Evolução da Antracnose	31
4.2. Avaliação dos estragos da mosca da azeitona	33
4.3. Condições climatéricas	34
4.4. Análise estatística	38
4.4.1. Matriz de correlação	38

4.4.2. ANOVA não paramétrica	39
4.5. Evolução da Antracnose e parâmetros de qualidade dos frutos	40
5. Discussão	43
6. Conclusão	47
7. Referências Bibliográficas.....	50
8. Apêndices	50
9. Anexos.....	60

Índice de Figuras

Figura 1- Ciclo de vida do colletotrichumm spp. nos seus hospedeiros	10
Figura 2 - Herdade Sousa	20
Figura 3 - Herdade do Farrobo	21
Figura 4 - Herdade do Monte Espada.....	21
Figura 5 - Planificação das árvores amostradas. Em cada pomar foi replicado o mesmo ensaio.	23
Figura 6 - Moinho de martelos para moenda das azeitonas.	25
Figura 7 - Aparelho Soxhlet e balão para extração do óleo da pasta de azeitona.	26
Figura 8 - Equipamento NIR para determinação do teor de água, óleo e acidez na pasta de azeitona.	28
Figura 9 - Analisador automático para determinação de percentagem de gordura, humidade e acidez em pasta de azeitona	28
Figura 10 - Ramos afetados pela antracnose em dezembro onde se observa desfoliação intensa.....	31
Figura 11 - Micélio de fungo na sequência dos estragos provocados pela mosca da azeitona.	33
Figura 12 - Precipitação acumulada durante o período de setembro 2024 a janeiro de 2025.	35
Figura 13 - Evolução da temperatura média diária no período de setembro 2024 a janeiro de 2025.	36
Figura 14 - Variação da humidade relativa durante o período de setembro 2024 a janeiro de 2025.	37
Figura 15 - Incidência de antracnose nos frutos para as diferentes datas de amostragem nos três pomares experimentais.	40
Figura 16 - Relação entre a fração de frutos perfurados e incidência de antracnose nos mesmos frutos.	41
Figura 17 - Relação entre a incidência de antracnose e o teor de acidez medido no azeite.....	42

Índice de quadros

Quadro 1 - Evolução da antracnose ao longo das datas de amostragem nas diferentes herdades.	32
Quadro 2 - Orifícios de oviposição e de saída da larva	33
Quadro 3 - Matriz de correlação entre as variáveis incidência de antracnose, incidência de mosca, teor de água, peso de 50 frutos, teor de óleo na matéria seca e acidez.	38
Quadro 4 – Anova não paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparação das datas de colheita.....	39
Quadro 5 – Anova não paramétrica para comparação da incidência de antracnose nos diferentes pomares experimentais	39

Lista de Abreviaturas

s. l. – *senso lato*

s. s. – *senso estrito*

spp. – múltiplas espécies dentro do género

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

COI – Conselho Oleícola Internacional

NIR – Near-Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho Próximo)

VCGs – Grupos de compatibilidade vegetativa

FDA – Food and Drug Administration

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das espécies cultivadas mais antigas do mundo. Ao longo do tempo, espalhou-se por diferentes regiões e tornou-se uma cultura muito importante na zona do Mediterrâneo. Nesta região, a oliveira tem grande valor económico, social e cultural, sendo parte essencial da paisagem e das tradições locais (Moral et al., 2014).

Quanto à sua origem, acredita-se que a espécie tenha surgido originalmente na Ásia, tendo se expandido posteriormente rumo ao oeste, acompanhando o contorno das margens do Mar Mediterrâneo (Diego et al., 2017; Rugini et al., 2005).

Existem fatores bióticos e abióticos que afetam as culturas, o pomar de oliveiras não é exceção e a sua produtividade pode ser fortemente comprometida por estes aspetos.

Uma das principais doenças que afeta não só o olival em si, mas também tem um impacto direto na qualidade do azeite é a antracnose, mais conhecida por gafa. Esta doença tem grande dispersão geográfica, afetando praticamente todos os olivais a nível mundial (F. Peres et al., 2021).

A antracnose da oliveira (*Olea europaea* L.) é uma doença relevante no Mediterrâneo, especialmente em Portugal. Os sintomas aparecem principalmente nos frutos maduros no outono húmido, com lesões escuras e afundadas que liberam massas de esporos alaranjados; folhas e ramos raramente são afetados (Talhinhas et al., 2005).

A presença da doença nos frutos compromete parâmetros físico-químicos e sensoriais essenciais, como a acidez, a estabilidade oxidativa, o aroma e o sabor, podendo levar à desvalorização comercial do azeite (Peres et al., 2021). Compreender esses efeitos permite implementar práticas agronómicas e tecnológicas mais eficazes, contribuindo para a preservação da qualidade do produto final, a redução de perdas económicas e a sustentabilidade da cadeia produtiva. Além disso, o estudo oferece um contributo relevante para o avanço do conhecimento científico, ao aprofundar a relação entre fitopatologia e qualidade do azeite, área ainda pouco explorada.

No caso das doenças, as alterações climáticas são também um fator adicional a ter em atenção, assim como fatores antropogénicos, caso da resistência aos fungicidas e a apetência dos consumidores para produtos de baixo nível de resíduos, nos alimentos.

Com este trabalho procura-se responder a estes desafios percebendo a relação da doença com as características do azeite produzido. A influência do clima na incidência da doença e eventualmente, estabelecer condições de decisão, para otimizar a data de colheita, tendo por base a incidência da antracnose nos frutos.

O estudo tem como principal objetivo analisar quais os fatores que promovem a gafa e sua influência nas características de qualidade do azeite. Desta forma, através da recolha faseada de frutos, será possível avaliar a influência da colheita precoce ou tardia nas características das azeitonas e nos azeites produzidos, fornecendo informações essenciais para a tomada de decisão quanto à data de colheita e contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de manejo que minimizem os impactos da gafa na olivicultura.

O presente trabalho tem como propósito investigar a influência da antracnose, uma das principais doenças fúngicas que afeta a cultura da oliveira, na qualidade final do azeite produzido. Considerando o impacto crescente das doenças fitossanitárias na produção agrícola e, em particular, na olivicultura, esta dissertação visa compreender de que forma a infecção por *Colletotrichum* spp. altera parâmetros físico-químicos e sensoriais do azeite, contribuindo para a redução do seu valor comercial e nutricional.

2. Estado da arte

2.1. A oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das plantas cultivadas há mais tempo pela humanidade. Com o passar dos séculos, expandiu-se por vários países e ganhou destaque no Mediterrâneo, onde é uma cultura essencial. Além de ter importância económica, faz parte da história, da cultura e da paisagem típica desta região. Essa espécie pertence à família Oleaceae, que inclui aproximadamente 600 outras espécies, com as quais partilha características botânicas comuns (Moral et al., 2014). Quanto à sua origem, acredita-se que a espécie tenha surgido originalmente na Ásia menor, tendo se expandido posteriormente rumo ao oeste, acompanhando o contorno das margens do Mar Mediterrâneo (Diego et al., 2017; Rugini et al., 2005).

O zambujeiro, também conhecido como oliveira-brava (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*), é a forma silvestre mais próxima da oliveira cultivada e é considerado o seu antepassado direto. Estudos históricos e arqueológicos indicam que a domesticação da oliveira teve origem no Médio Oriente, durante a Idade do Bronze, através da seleção das plantas de zambujeiro mais produtivas e resistentes. Este processo ocorreu há cerca de 6000 a 5500 anos, marcando o início da olivicultura (Zohary & Spiegel-Roy, 1975). Mais tarde, as primeiras variedades de oliveira obtidas foram reproduzidas por propagação vegetativa e espalharam-se, de forma gradual, por todo o Mediterrâneo. Este processo começou com os fenícios e foi depois continuado por outras civilizações que contribuíram para a expansão do cultivo da oliveira na região (Rallo et al., 2005). Apesar disso, não é de excluir a ocorrência de processos de domesticação secundária em regiões afastadas do Médio Oriente, como a Espanha ou o Magrebe. Contudo, estas áreas são geralmente reconhecidas como centros de diversificação genética da oliveira, e não como centros de domesticação. (Besnard et al., 2013; Moral et al., 2014).

Atualmente a oliveira, ocupa de forma natural, toda a bacia mediterrânica, onde existem 95% dos olivais a nível mundial (Diego et al., 2017; Moral et al., 2014; Rugini et al., 2005). No entanto graças a intervenção humana esta espécie também ocupa territórios onde o clima também é mediterrâneo como por o exemplo a Argentina, Austrália, Chile e África do sul (Moral et al., 2014).

Estima-se, atualmente existirem cerca de 2.500 variedades de oliveira (Moral et al., 2014), embora apenas algumas tenham colonizado uma vasta gama de zonas agroclimáticas (De Caraffa et al., 2002; Moral et al., 2014).

A oliveira é uma das mais importantes produtoras de óleo vegetal, o azeite foi reconhecido como um “alimento medicinal” pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA), graças ao seu comprovado efeito protetor contra doenças cardiovasculares. Com essa designação, passou a integrar o seleto grupo de alimentos com propriedades terapêuticas (Moral et al., 2014).

2.2. Antracnose ou gafa da oliveira

A antracnose da oliveira é das doenças que mais afeta a cultura da oliveira tanto na produção como na qualidade do azeite não só em Portugal, como no resto do mundo. Essa doença compromete seriamente a qualidade e o rendimento das azeitonas (Peres et al., 2021).

É causada por um complexo de diversas espécies de *Colletotrichum* spp. Os patógenos mais comuns em Portugal são *Colletotrichum nymphaeae* L., *Colletotrichum godetiae* L., *Colletotrichum acutatum* L., *Colletotrichum gloeosporioides* L. A presença dessas espécies nos olivais representa um desafio constante para os produtores, exigindo estratégias eficazes de monitorização e controlo para minimizar os prejuízos na produção e na qualidade do azeite (Peres et al., 2021). A gafa da oliveira é causada por fungos de diversas espécies (Loureiro et al., 2018).

2.3. Etiologia e taxonomia

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas que afetam a oliveira (Loureiro et al., 2018; Peres et al., 2021; Talhinhos et al., 2005), foi descrita pela primeira vez em Portugal por Veríssimo de Almeida, sob a designação de *Gloeosporium olivarum* (Ameida, 1899). Mais tarde, esta espécie viria a ser reclassificada como *Colletotrichum gloeosporioides* por von Arx, em 1957 (von Arx, 1957). Contudo, foi apenas em 1999 que Martín e García-Figueres identificaram a existência de dois agentes causais distintos da doença: *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Loureiro et al., 2018; Talhinhos et al., 2005).

Dentro do complexo *C. acutatum* (s.l.), destacam-se seis espécies: *C. simmondsii*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. acutatum* (s.s.), *C. nymphaeae* e *C. rhombiforme*. Já no complexo *C. gloeosporioides* (s.l.), são reconhecidas duas espécies: *C. theobromicola* e *C.*

gloeosporioides (s.s.) (Baroncelli et al., 2017; Loureiro et al., 2018; Mosca et al., 2014; Schena et al., 2014).

Em Portugal, a gafa da oliveira é causada, maioritariamente, por espécies do complexo *C. acutatum* (s.l.), responsáveis por cerca de 97% das infeções, enquanto o complexo *C. gloeosporioides* representa apenas cerca de 3%. Dentro do primeiro grupo, a espécie *C. nymphaeae* é largamente dominante, representando 80% dos isolados, seguida por *C. godetiae* (12%) e *C. acutatum* (s.s.). (3–4%). Espécies como *C. fiorinae* têm sido identificadas pontualmente, em diferentes anos e localizações, enquanto *C. rhombiforme* foi isolada apenas uma vez, na região de Trás-os-Montes (Loureiro et al., 2018; Talhinhos et al., 2005, 2011).

A distribuição geográfica destas espécies em Portugal revela padrões distintos. *C. nymphaeae* predomina na maioria das regiões do país, com exceção de Trás-os-Montes, onde *C. godetiae* é a espécie mais frequentemente identificada (Loureiro et al., 2018; Talhinhos et al., 2011). A região do Algarve destaca-se pela elevada diversidade genética, tendo sido identificadas quatro espécies diferentes com frequências relativamente semelhantes: *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. godetiae* e *C. acutatum* (s.s.) (Loureiro et al., 2018).

Apesar da estabilidade observada no padrão populacional em Portugal, a nível da bacia do Mediterrâneo têm sido registadas alterações. A espécie *C. godetiae*, anteriormente predominante, parece estar a ser gradualmente substituída por *C. acutatum* (s.s.), fenómeno já verificado em países como Itália, Tunísia e Grécia (Loureiro et al., 2018; Mosca et al., 2014). No Hemisfério Sul, esta última espécie é igualmente predominante, nomeadamente na África do Sul e na Austrália. Curiosamente, nesta última tem também sido identificado *C. theobromicola* como agente associado à gafa da oliveira (Loureiro et al., 2018).

2.4. Ciclo de Vida e Epidemiologia de *Colletotrichum* spp. na Oliveira

A gafa da oliveira é causada por fungos do género *Colletotrichum* spp, englobando diferentes espécies responsáveis por estratégias de colonização que variam desde relações discretas e assintomáticas até comportamentos agressivos e destrutivos (De Silva et al., 2017; Loureiro et al., 2018; Peres et al., 2005; Perfect et al., 1999). O conhecimento sobre os principais aspetos do ciclo e da epidemiologia desta doença remonta à descrição inicial do agente patogénico por Almeida, em 1899, tendo sido atualizado em diversos estudos posteriores (Loureiro et al., 2018; Moral et al., 2009, 2014; Talhinhos et al., 2011).

O êxito de *Colletotrichum* spp. está associado à sua capacidade de sobrevivência e disseminação. Estes fungos persistem na ausência de frutos maduros sob a forma de conídios latentes em folhas e ramos, tanto da oliveira como de outras espécies vegetais, podendo crescer de forma epifítica e esporular (Loureiro et al., 2018; Talhinhos et al., 2011). Os conídios nestes órgãos germinam, embora com taxas inferiores às observadas em azeitonas maduras, formando tubos germinativos frequentemente associados à conidiogénese secundária (Loureiro et al., 2018; Talhinhos et al., 2011).

Durante a floração, as flores podem albergar infeções assintomáticas desde os primeiros estádios até ao desenvolvimento dos frutos. Estudos demonstraram que isolados de *C. acutatum* (s.l.) e *C. gloeosporioides* (s.l.) colonizam várias partes florais, incluindo cálice, pétalas, estames e pistilo, onde também podem esporular (Loureiro et al., 2018; Moral et al., 2009; Sergeeva et al., 2008; Talhinhos et al., 2011). Se as flores não forem destruídas, a infeção pode permanecer latente até à maturação dos frutos, embora o impacto dessas infeções precoces na produção final ainda não esteja totalmente esclarecido (Moral et al., 2009).

Estudos comparativos entre variedades ao longo de duas campanhas mostraram que as folhas acumulam níveis mais elevados de inóculo do que os ramos, mas este decresce mais rapidamente nas folhas durante o verão. Assim, as folhas funcionam como reservatórios de curto prazo, enquanto os ramos desempenham esse papel de forma mais prolongada. Verificou-se ainda que a severidade da doença se correlaciona mais com as condições meteorológicas do outono do que com as da primavera, sugerindo que as infeções em flores e frutos jovens têm papel limitado no desenvolvimento final da doença (Talhinhos et al., 2011). Em regiões subtropicais, a doença pode apresentar maior risco, uma vez que as chuvas de verão favorecem a manutenção e aumento do inóculo, ao contrário do padrão mediterrânico (Loureiro et al., 2018).

O processo de infeção inicia-se quando conídios depositados na superfície da azeitona germinam e formam um apressório melanizado, permitindo a penetração dos tecidos do hospedeiro. Tanto em *C. nymphaeae* como em *C. gloeosporioides*, esta penetração ocorre por meio de uma hifa especializada. Em frutos verdes, o desenvolvimento cessa até à maturação, enquanto em frutos maduros forma-se uma hifa primária multilobada na primeira célula epidérmica invadida, caracterizando uma fase biotrófica breve. Segue-se a fase necrotrófica, marcada por intensa colonização dos tecidos necrosados e formação de acérvulos, culminando no aparecimento das lesões típicas e rutura da cutícula (Talhinhos et al., 2011).

Os frutos infetados produzem grandes quantidades de conídios, que originam infecções secundárias. Posteriormente, sofrem mumificação devido à desidratação e podridão dos tecidos. Os frutos mumificados no solo têm pouca relevância epidemiológica, pois são rapidamente decompostos; em contraste, os que permanecem na árvore representam fontes importantes de inóculo, capazes de libertar conídios durante pelo menos seis meses (Loureiro et al., 2018; Moral & Trapero, 2012; Talhinhos et al., 2011). Contudo, em média, estes frutos persistem apenas até ao outono seguinte, reforçando o papel dos órgãos vegetativos como reservatórios de inóculo (Moral & Trapero, 2012).

No que respeita à biologia reprodutiva, o ciclo de vida de espécies de *Colletotrichum*, (Figura 1) inclui fases sexual e assexual. A fase sexual promove variabilidade genética, enquanto a fase assexual assegura a disseminação. Contudo, a recombinação sexual ocorre raramente na natureza, sendo que apenas cerca de 11 espécies apresentam teleomorfos conhecidos (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Em *C. acutatum*, a fase sexual nunca foi observada em condições naturais, mas o teleomorfo (*Glomerella acutata*) foi induzido em laboratório, sugerindo a possibilidade de recombinação sexual (Johnston & Jones, 1997; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

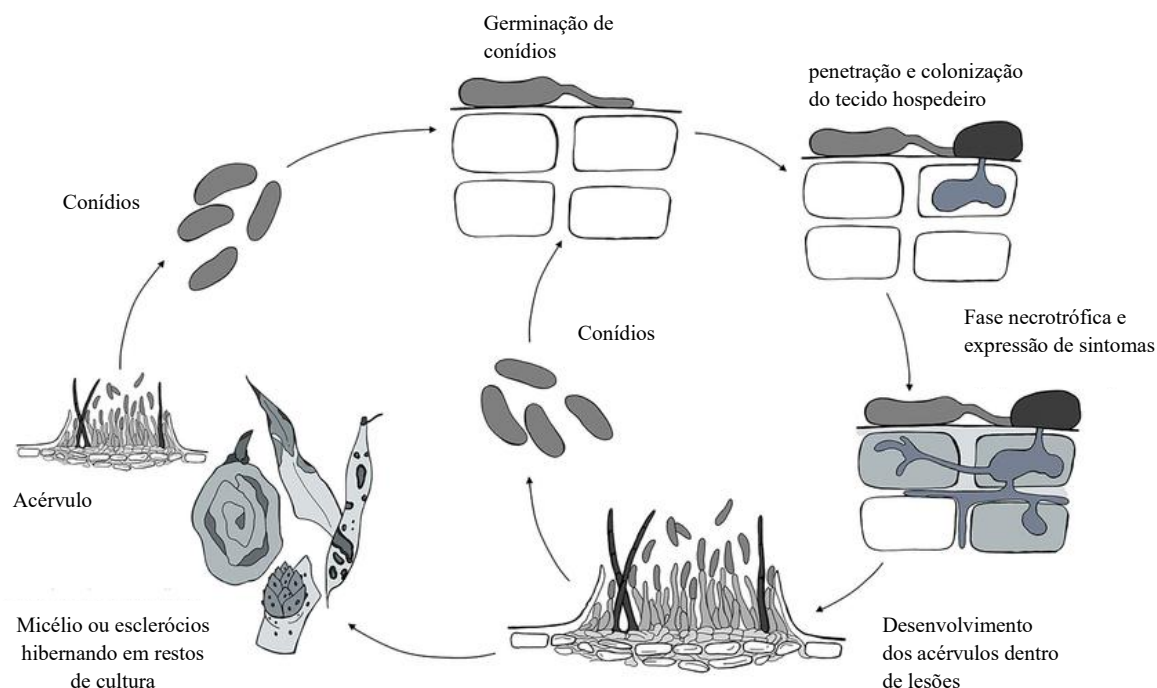


Figura 1- Ciclo de vida do *colletotrichumm* spp. nos seus hospedeiros

Fonte: Salotti et al., 2025

Outro mecanismo de variabilidade é a compatibilidade vegetativa, caracterizada pela fusão de hifas de estirpes distintas. Quando compatíveis, formam células heterocarióticas viáveis, permitindo intercâmbio genético; quando incompatíveis, os isolados permanecem geneticamente isolados (Chacko et al., 1994; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). A análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCGs) tem sido usada para investigar a estrutura populacional de várias espécies, incluindo *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, revelando que muitos aspectos da genética da compatibilidade permanecem pouco compreendidos (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

O agente causal da antracnose pode infectar diversas estruturas da oliveira, incluindo gomos, flores, sépalas, pedicelos, pedúnculos, folhas, pecíolos, rebentos, ramos, recetáculos e frutos (Sergeeva, 2011). Sobrevive ao inverno principalmente em frutos mumificados retidos na árvore, tecidos lenhosos infetados, pedúnculos e folhas do ano anterior, constituindo fontes primárias de inóculo. Os sintomas iniciais nos frutos manifestam-se como pequenas manchas castanhas deprimidas que se expandem rapidamente, geralmente no ápice, região mais húmida após chuvas ou orvalho. Estas lesões podem coalescer e provocar enrugamento, escurecimento e mumificação dos frutos (Sergeeva, 2011). Durante infecções ativas, massas viscosas de esporos de cor salmão-alaranjada ou creme são

produzidas e dispersas por salpicos de água, perpetuando ciclos sucessivos de infecção e esporulação (Sergeeva, 2011).

Assim, o ciclo de vida da gafa resulta da interação complexa entre fatores ambientais, características da cultivar e dinâmica populacional do patógeno, tornando o seu controle um desafio significativo na olivicultura mediterrânica e em regiões subtropicais em expansão (Sergeeva, 2011).

2.5. Relação com o clima

A germinação dos conídios de *Colletotrichum* spp. é mais eficiente em temperaturas entre 20 e 25 °C, intervalo considerado ideal para o início do processo de infecção (Moral et al., 2012). No entanto, durante o outono nas regiões de clima mediterrânico, estação em que a doença se manifesta com maior intensidade, estas condições ideais nem sempre se verificam. Apesar da elevada precipitação e humidade relativa típica deste período, as temperaturas nem sempre atingem valores ótimos para a germinação dos conídios, o que pode limitar, em parte, a ocorrência da infecção (Loureiro et al., 2018).

Para que o fungo consiga efetivamente infetar os tecidos do hospedeiro, não basta a presença de conídios viáveis e temperaturas favoráveis. É também necessária a presença de água livre na superfície da planta ou, pelo menos, uma humidade relativa superior a 98%. A faixa de temperatura mais propícia à infecção situa-se entre 17 e 20 °C, intervalo no qual a penetração do patógeno ocorre de forma mais rápida e eficiente. Ainda assim, a infecção pode acontecer fora desta faixa, em temperaturas entre 5 e 30 °C, embora nestas condições o desenvolvimento da doença seja mais lento, já que o fungo entra num período de latência até que o ambiente volte a ser favorável (Loureiro et al., 2018).

Observações de campo realizadas no sul de Espanha indicam que a doença é particularmente grave em olivais plantados com cultivares suscetíveis. Apesar de existirem numerosos estudos sobre a antracnose da oliveira, a informação sobre os efeitos do ambiente nas epidemias da doença ainda é escassa. Para além da temperatura e do estado de maturação dos frutos, a precipitação é provavelmente um fator crítico na maioria das epidemias (Moral et al., 2012). A maior parte da investigação foi conduzida em condições de campo, sendo limitados os dados obtidos em ambientes controlados. No entanto, essa informação é essencial para compreender e controlar patógenos foliares e constitui base fundamental para

o desenvolvimento de submodelos de infecção, componentes-chave na previsão de doenças (Moral et al., 2012).

De modo geral, para a maioria dos patógenos fúngicos em ambientes terrestres, a infecção é limitada pela duração da humidade superficial ou pela combinação de níveis elevados de humidade e temperatura. Neste contexto, o conhecimento dos fatores ambientais e agronómicos que influenciam o desenvolvimento da antracnose é essencial para determinar o momento mais adequado para aplicações de fungicidas, assim como para o desenvolvimento de modelos preditivos da evolução das epidemias durante o outono (Moral et al., 2012).

2.6. Controlo da doença

O controlo da gafa é, habitualmente, obtido através da integração de diferentes métodos, que incluem desde práticas culturais até à aplicação de fungicidas ou ao uso de estratégias de controlo biológico. Entre as práticas culturais, destaca-se a importância da escolha da variedade, dado que a suscetibilidade varia consideravelmente e depende das espécies de fungo presentes na região (Loureiro et al., 2018; Moral et al., 2017; Talhinhos et al., 2015). Além disso, recomenda-se igualmente a adoção de técnicas de cultivo que promovam a sanidade das plantas, com destaque para a prática de uma fertilização equilibrada, uma gestão adequada da rega e a realização de podas corretas (Loureiro et al., 2018; Sergeeva, 2011). Práticas que favoreçam o arejamento, a entrada de luz solar e a redução da humidade ajudam a limitar a fonte e dispersão do inóculo, diminuindo a severidade da doença. A poda e a remoção de partes afetadas, incluindo frutos mumificados, reduzem as fontes de inóculo para campanhas futuras (Sergeeva, 2011). Em zonas com elevada incidência da doença, o controlo baseia-se principalmente na aplicação de fungicidas cúpricos e na escolha criteriosa da data de colheita. Esta decisão deve considerar o estado de maturação da azeitona (equilíbrio entre rendimento em azeite e teor de compostos fenólicos), as condições meteorológicas (antecipando a colheita antes de períodos húmidos) e limitações agronómicas (dificuldade na colheita mecânica de frutos ainda verdes). A aplicação dos fungicidas cúpricos é recomendada aquando das primeiras chuvas de outono, antes do aparecimento dos sintomas, sendo necessário repetir os tratamentos conforme a suscetibilidade da cultivar, a maturação dos frutos e a frequência das chuvas (Moral et al.,

2014). No entanto, em condições ambientais particularmente favoráveis ao desenvolvimento da doença, esta estratégia pode tornar-se ineficaz. Algumas espécies de *Colletotrichum* demonstram tolerância ao cobre, o qual é facilmente lixiviado pela chuva, e a repetição dos tratamentos pode ser dificultada quando as chuvas outonais são persistentes. Adicionalmente, o uso continuado de cobre levanta preocupações ambientais, devido à sua acumulação no solo e nos recursos hídricos. Como alternativa, têm sido utilizados fungicidas orgânicos com bons níveis de proteção, embora muitos não estejam ainda autorizados para aplicação em olivais na União Europeia ou apresentem desvantagens económicas. Em Portugal, apenas estão homologados para o controlo da gafa os fungicidas cúpricos, como o hidróxido, oxiclureto, sulfato de cobre e o sulfato de cobre e cálcio com ação preventiva, e a trifloxistrobina, um fungicida sistémico com ação preventiva e curativa, todos autorizados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

Antecipar a colheita pode ser uma das estratégias mais eficazes para evitar que as azeitonas sejam afetadas pela doença, já que a sua suscetibilidade aumenta à medida que o fruto atinge maiores níveis de maturação (Loureiro et al., 2018; Moral et al., 2015).

2.7. Mosca da azeitona

A *Bactrocera oleae* Rossi, também conhecida como mosca-da-azeitona, é uma praga que se alimenta exclusivamente do fruto da oliveira (Daane & Johnson, 2010). É considerada uma praga chave na cultura da oliveira. As fêmeas adultas depositam os seus ovos dentro das azeitonas, logo abaixo do epicarpo, proporcionando acesso direto ao alimento para as larvas após a eclosão do ovo, cada fêmea, na natureza, consegue depositar cerca de 12 ovos por dia e 200 a 250 durante a sua vida (Malheiro et al., 2015).

A mosca da azeitona (*B. oleae*) está distribuída por todas principais regiões olivícolas do mundo. A sua presença é particularmente significativa na bacia do Mediterrâneo, onde afeta diversos países da Europa, como Grécia, Itália, Espanha e Portugal, incluindo também várias ilhas como os Açores, Baleares, Sicília, Sardenha, bem como Chipre, França, Malta, Suíça, Turquia e os países dos Balcãs. Em África, a praga está presente principalmente no Norte do continente, nomeadamente na Argélia, Egito, Líbia, Marrocos e Tunísia, mas também ocorre em regiões da África Central, como Angola, Eritreia, Etiópia, Quênia e Sudão, e em áreas da África Austral, como a África do Sul e as Ilhas Canárias. No continente

asiático, é encontrada em vários países do Médio Oriente, como Israel, Jordânia, Líbano, Arábia Saudita e Síria, estendendo-se ainda à China, Índia e Paquistão. A espécie foi introduzida acidentalmente na Califórnia, Estados Unidos, em 1998, tendo-se espalhado por toda a região produtora de azeitona até 2004, e posteriormente chegou ao México. Já na América do Sul, a mosca da azeitona encontra-se presente em países como Argentina, Chile, Peru e Uruguai. A Austrália destaca-se como uma das poucas regiões produtoras de azeitona no mundo onde a presença da *B. oleae* ainda não foi registada (Malheiro et al., 2015).

O desenvolvimento do inseto passa por três instares larvais; a larva recém-eclodida alimenta-se como perfuradora do mesocarpo e ao final do terceiro estágio, pode pupar na azeitona ou sair para pupar no solo. O desenvolvimento larval de *B. oleae* depende largamente da temperatura, e o número de gerações anuais também depende da humidade e da disponibilidade/qualidade dos frutos (Malheiro et al., 2015).

As perfurações da postura de ovos causa grande depreciação dos frutos para consumo de mesa, enquanto os efeitos negativos na produção de azeite incluem queda prematura dos frutos, consumo de polpa pelas larvas (de 50 a 150 mg por larva, conforme o cultivar) e deterioração da qualidade do azeite. O grau dessa deterioração depende do tipo de infestação, percentagem de frutos danificados, estágio de desenvolvimento do fruto e do cultivar em questão (Malheiro et al., 2015).

Frutos com perfurações de saída, produzidos por larvas já desenvolvidas, têm sua integridade celular destruída e os tecidos internos expostos ao oxigênio, acelerando processos hidrolíticos e oxidativos que elevam a acidez livre e o valor de peróxido do azeite (Malheiro et al., 2015).

Os limites atuais para acidez livre e valor de peróxido do azeite virgem são de 0,8% de ácido oleico e 20 mEq O₂/kg de azeite, respetivamente. A concentração de compostos fenólicos ainda não é critério oficial de classificação, mas é consenso que esses compostos estão diretamente ligados às propriedades sensoriais e funcionais do azeite virgem (Gucci et al., 2012; Malheiro et al., 2015).

2.7.1. Relação da mosca com a antracnose

A mosca da azeitona mediterrânica (*B. oleae*), é uma das principais pragas causadoras de feridas na cutícula dos frutos, estas lesões favorecem a entrada e instalação de agentes patogénicos responsáveis pela antracnose e posteriormente o desenvolvimento no interior do fruto. Desta maneira a mosca da azeitona mediterrânica não só afeta a integridade física do fruto como também contribui significativamente para o aumento da incidência de gafa, uma das principais doenças que afetam, de forma considerável, a qualidade e o rendimento da produção. Por este motivo, o controlo eficaz desta praga é crucial não só para evitar danos diretos como também para prevenir infeções associadas a este tipo de lesões (Loureiro et al., 2018).

2.8. Como é afetada a qualidade do azeite pela antracnose

A obtenção de azeites de elevada qualidade é um objetivo transversal a todos os olivicultores (Moral et al., 2014).

Para que se obtenham azeites de qualidade elevada (extra virgens e virgens) os frutos não devem conter praticamente nenhum defeito, quer sejam picadas de insetos, presença de fungos, etc. pois isso vai interferir diretamente na qualidade do mesmo, outros fatores que também influenciam esta qualidade são, agronómicos, climáticos e culturais (Moral et al., 2014).

A obtenção de um azeite de qualidade é uma premissa fundamental para qualquer olivicultor. Para isso, é necessário ter em conta os diferentes fatores que podem influenciar a qualidade do produto final em qualquer uma das etapas do seu processo de produção. Os fatores climáticos, edáficos, agronómicos e, especialmente, os relacionados com colheita ou com estado sanitário da azeitona influencia significativamente a qualidade do azeite de oliva (Moral et al., 2014).

Os parâmetros físico-químicos (acidez livre, índice de peróxidos, absorvância no ultravioleta K270 e K232) e sensoriais que permitem distinguir as categorias comerciais do azeite virgem. Por sua vez, os azeites de maior qualidade (extra virgem) diferenciam-se pela quantidade e intensidade das suas características sensoriais, tanto ao nível do olfato como do paladar. Regra geral, os azeites obtidos a partir de azeitonas caídas apresentam uma acidez elevada e uma qualidade sensorial deteriorada (Peres et al., 2024). Quando as azeitonas caídas representam entre 5 a 10% do total dos frutos, regista-se uma descida notável da qualidade do azeite (Famiani et al., 2001; Moral et al., 2014).

O estado de maturação da azeitona também tem uma influência marcante na qualidade do azeite. Em geral, o teor de compostos fenólicos aumenta nas fases iniciais da maturação e diminui posteriormente. Durante a maturação, verifica-se ainda um aumento do teor de ácido linoleico e, por vezes, do ácido oleico, enquanto os ácidos palmítico e esteárico tendem a diminuir, causando uma redução da relação entre ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados (Moral et al., 2014).

Para determinar o momento ideal de colheita, recomenda-se a realização de análises periódicas às azeitonas, sendo que, geralmente, esse momento coincide com a fase em que a pigmentação se limita à epiderme. Assim, os sistemas de colheita mais aconselhados são aqueles que permitem colher rapidamente as azeitonas no momento ótimo de maturação, evitando a sobre maturação e a queda ao solo, e que não danificam a epiderme dos frutos.

Entre estes sistemas, destacam-se os vibradores, quer de tronco quer manuais, bem como as máquinas automotrizes sobre as copas utilizadas em olivais de sebe de alta densidade (Moral et al., 2014).

Uma vez colhidas as azeitonas, os processos subsequentes tais como transporte, armazenamento, batedura, centrifugação e armazenamento do azeite também influenciam fortemente a qualidade do produto final. A obtenção de azeite de qualidade exige o uso de azeitonas sãs, ou seja, que não estejam afetadas por insetos ou organismos patogénicos que provoquem alterações nos frutos (Runcio et al., 2008). Entre os insetos, destaca-se a mosca da azeitona (*B. oleae*), que pode causar perdas significativas tanto na produção como na qualidade do azeite, devido à queda dos frutos e às galerias escavadas pelas larvas na polpa (Moral et al., 2014).

Uma elevada infestação por mosca está associada a aumentos na acidez livre, na absorvância no ultravioleta e no índice de peróxidos (Moral et al., 2014; Mraicha et al., 2010; Tamendjari et al., 2009). bem como a uma diminuição da estabilidade e do teor de compostos fenólicos no azeite (Gómez-Caravaca et al., 2008; Moral et al., 2014; Mraicha et al., 2010; Tamendjari et al., 2009). Na maioria dos casos, os agentes biológicos que, em última instância, deterioram a qualidade do azeite os fungos filamentosos as leveduras que colonizam as galerias das larvas da mosca (Moral et al., 2014).

As espécies de *Colletotrichum* causam podridão e queda prematura das azeitonas, originando azeites com uma coloração avermelhada, aumento da acidez e má qualidade organolética, com a presença de defeitos como terra, bolor e sabor húmido-terroso (Carvalho et al., 2008; Moral et al., 2014). Em geral, à medida que aumenta a percentagem de frutos afetados por antracnose, regista-se uma diminuição progressiva da qualidade dos azeites extraídos. Azeites obtidos a partir de azeitonas afetadas apresentam um aumento no índice de peróxidos e, sobretudo, na acidez livre (Iannotta et al., 1999), bem como uma redução da estabilidade oxidativa, do teor de polifenóis e de α -tocoferol (Moral et al., 2014).

Deste modo, azeites provenientes de lotes com uma incidência de 15–20% de frutos afetados deixam de ser classificados como azeites virgens extra. Quando a incidência ultrapassa os 40–45%, esses azeites já não podem sequer ser classificados como azeite virgem, por apresentarem uma acidez superior a 0,8% e 2%, respetivamente (Carvalho et al., 2008; Moral et al., 2014).

Runcio et al. (Runcio et al., 2008) demonstraram que os azeites obtidos a partir de azeitonas infetadas pelo patógeno apresentam um aumento significativo no teor de aldeídos (Runcio et al., 2008), nomeadamente heptanal, octanal e nonanal, atribuídos a

reações de decomposição de hidroperóxidos formados durante a auto-oxidação do ácido oleico (Vichi et al., 2003). Além disso, a infecção por *Colletotrichum* afeta também os álcoois alifáticos, os compostos terpénicos e o teor de ceras (Moral et al., 2014).

Por fim, o teor dos ácidos gordos nos azeites obtidos a partir de azeitonas degradadas devido ao empilhamento prolongado em condições húmidas aumenta de forma considerável. Assim, é de esperar que a presença de *Colletotrichum* spp., responsável pelo aumento da acidez livre e do teor de álcoois alifáticos, provoque uma maior esterificação entre os ácidos gordos e os álcoois (Gómez-Coca et al., 2012).

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da exploração

3.1.1. Localização das parcelas

Os ensaios foram conduzidos em três pomares de oliveiras, da empresa Innoliva, localizados na região do Alentejo (Portugal), concretamente nos concelhos de Évora, Serpa e Ferreira do Alentejo. Em todas as explorações agrícolas incluídas no estudo, a única cultura presente é o olival em copa, não existindo outras culturas associadas.

No concelho de Évora, o estudo foi desenvolvido na Herdade Sousa, uma exploração agrícola dedicada exclusivamente à olivicultura, tem um compasso de 6x4 metros. Esta herdade encontra-se situada nas coordenadas 38°35'35" N; 7°46'04" W, a uma elevação de 248,6 metros acima do nível do mar que tem cerca aproximadamente 500 hectares (Figura 2).



Figura 2 - Herdade Sousa

No concelho de Serpa, o ensaio foi realizado na Herdade do Farrobo, uma exploração agrícola igualmente dedicada em exclusivo ao olival em copa, tem um compasso de 6x4 metros. A herdade encontra-se situada nas coordenadas 37°57'37" N; 7°39'08" W, a uma elevação de 128,09 metros acima do nível do mar e tem aproximadamente 172 hectares (Figura 3).



Figura 3 - Herdade do Farrobo

Na zona de Ferreira do Alentejo, o ensaio foi conduzido na Herdade do Monte Espada, exploração agrícola dedicada exclusivamente ao cultivo de olival em copa, tem um compasso de 6x4 metros. A herdade localiza-se nas coordenadas 37°57'24" N; 8°18'29" W, a uma elevação de 61,86 metros acima do nível do mar e tem cerca de 167 hectares (Figura 4).



Figura 4 - Herdade do Monte Espada

3.1.2. Caracterização climática

Os dados meteorológicos utilizados neste estudo foram recolhidos pela estação automática Vigia APAP, no período compreendido entre setembro de 2024 e janeiro de 2025. Durante este intervalo, a temperatura média diária foi de 15,2 °C, registando-se uma temperatura mínima média de 9,9 °C e uma temperatura máxima média de 22,3 °C. A humidade relativa apresentou uma média de 75,4 %, enquanto a precipitação total acumulada foi de 280,3 mm. A evapotranspiração de referência (ET₀) apresentou um valor médio diário de 2,2 mm, indicando uma taxa moderada de evaporação para a região no período em análise (Vigia APAP, 2025).

3.2. Delineamento do ensaio

3.2.1. Em campo

Nos diferentes pomares avaliados foi definido um critério de amostragem padronizado de modo a permitir a comparação direta da incidência de antracnose nos frutos. Em cada pomar foram selecionadas duas linhas de árvores de forma aleatória deixando outras duas linhas entre si, garantindo representatividade dentro da parcela. Em cada linha marcada foram escolhidas 10 árvores consecutivas, resultando num total de 20 árvores por data e pomar, conforme ilustrado na Figura 5.

Para assegurar independência entre as repetições, foi estabelecido um intervalo fixo de duas linhas não avaliadas entre cada linha observada. Além disso, de forma a reduzir a tendência associado às extremidades do pomar, as duas primeiras árvores de cada linha foram excluídas da contagem, iniciando-se a avaliação apenas a partir da terceira árvore.

A delimitação das linhas avaliadas foi realizada com recurso a fita de marcação vermelha, colocada de forma visível no início e ao longo das duas filas selecionadas, permitindo a identificação clara dos blocos de observação durante todo o período experimental.

Todas as avaliações foram conduzidas em pomares de cultivar Arbequina, reconhecida pela sua elevada suscetibilidade à antracnose, o que assegura condições favoráveis para a expressão da doença e maior sensibilidade na comparação entre locais.

Assim, cada repetição corresponde a um bloco, com 10 árvores consecutivas por fila, totalizando 20 árvores avaliadas por data. O espaçamento de duas filas sem observação entre repetições garante que os blocos de observação sejam independentes, mas ainda suficientemente próximos para estarem sujeitos a condições ambientais semelhantes.

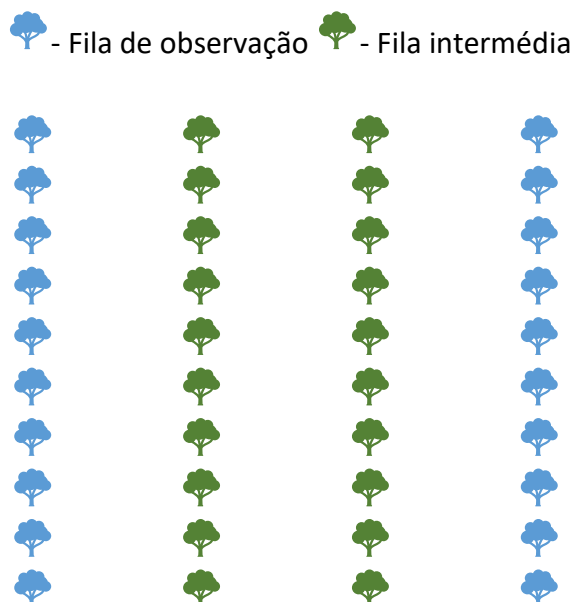


Figura 5 - Planificação das árvores amostradas. Em cada pomar foi replicado o mesmo ensaio.

Seguidamente, procedeu-se à colheita dos frutos nas árvores previamente marcadas. Em cada árvore foram recolhidos, de forma aleatória e representativa, aproximadamente 30 frutos, garantindo a inclusão de diferentes posições na copa (interior/exterior e diferentes alturas), de modo a minimizar o erro sistemático da amostragem.

Após a recolha, os frutos provenientes das 10 árvores de cada linha foram misturados e homogeneizados, formando uma única amostra composta por linha. Desta forma, em cada pomar resultaram por data duas repetições independentes, correspondentes às duas linhas selecionadas para observação.

A opção por misturar os frutos dentro de cada linha teve como objetivo reduzir a variabilidade individual entre árvores e obter uma amostra média representativa da condição fitossanitária daquela linha. Assim, cada repetição constitui-se como um reflexo da incidência e severidade da antracnose no conjunto de árvores avaliadas, permitindo comparações robustas entre pomares.

No total, cada repetição corresponde a aproximadamente 300 frutos (10 árvores $\times$ 30 frutos/árvore), perfazendo cerca de 600 frutos por pomar avaliados.

3.2.1. Em laboratório

No laboratório, foi retirada uma subamostra constituída por cinquenta frutos, selecionados do conjunto total recolhido no campo. Em cada fruto procedeu-se à avaliação da presença de sintomas de antracnose e de danos provocados pela mosca da azeitona. Determinou-se ainda a percentagem de frutos perfurados e registou-se o peso total da subamostra de cinquenta frutos, de forma a obter parâmetros comparáveis entre as diferentes amostras analisadas.

3.3. Avaliação dos Parâmetros do Azeite

Nesta fase do estudo, foi realizada a análise do azeite extraído de todos os frutos previamente amostrados (cerca de 300 frutos por repetição e data). Foram avaliados diversos parâmetros relacionados à composição e qualidade do azeite, nomeadamente o teor de humidade dos frutos, a quantidade de azeite em relação ao peso fresco, a quantidade de azeite em relação à matéria seca e o teor de acidez. Todos os dados obtidos foram expressos em percentagem, permitindo uma análise comparativa e objetiva entre os diferentes parâmetros estudados, bem como a avaliação da eficiência da extração e da qualidade do azeite produzido a partir da amostra selecionada.

3.3.1. Métodos de Análise Laboratorial da Azeitona: Teor de água, óleo e acidez

A caracterização físico-química das amostras de azeitona foi realizada com base em três parâmetros principais: o teor de água, o teor de óleo e a acidez livre, utilizando tanto métodos de referência laboratoriais como métodos instrumentais baseados em tecnologia NIR (Near Infrared). Todos os procedimentos adotados seguem as normas técnicas reconhecidas, nomeadamente as descritas no Regulamento Comunitário n.º 2568/91 e nos documentos técnicos do Conselho Oleícola Internacional (COI).

3.3.1.1. Determinação do teor de água

A avaliação da humidade das amostras foi realizada por método gravimétrico, através de secagem em estufa com monitorização de peso. Antes do início do ensaio, duas cápsulas

metálicas foram secas a 105 °C em estufa, arrefecidas em exsicador e taradas. Em seguida, a azeitona foi moída até se obter uma pasta homogênea (Figura 6). Foram pesados exatamente 5,000 g de amostra em cada cápsula, com uma precisão de $\pm 0,001$ g.



Figura 6 - Moinho de martelos para moenda das azeitonas.

As cápsulas, contendo as respetivas amostras, foram introduzidas destapadas na estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período inicial de 4 horas. Após esse tempo, as cápsulas foram retiradas, tapadas, arrefecidas no exsicador por aproximadamente 45 minutos e pesadas. Em seguida, reiniciou-se o ciclo de secagem por mais uma hora, seguido de nova pesagem. Este processo foi repetido até que a diferença entre duas pesagens consecutivas fosse inferior a 0,2% da massa inicial da amostra (equivalente a 0,01 g), assegurando assim que a perda de massa era exclusivamente devida à evaporação da água.

O teor de humidade foi calculado com base na diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra seca, utilizando a fórmula (equação 1):

Equação 1

$$\% \text{água} = \frac{(m_1 + m_2) - m_3}{m_1} \times 100$$

onde m_1 representa a massa da amostra para análise, m_2 a massa da cápsula vazia e m_3 a massa da cápsula com a amostra após secagem.

3.3.1.2. Determinação do teor de óleo pelo método de referência (Extração por Soxhlet)

Este método consiste na extração de óleo com recurso a éter de petróleo, utilizando um aparelho de Soxhlet acoplado a um balão de 250 mL, tal como se pode observar Figura 7. Inicialmente, a azeitona foi moída e homogeneizada, e uma toma de aproximadamente 25,000 g foi embrulhada num cartucho de papel de filtro. Para garantir a eficiência da extração, a amostra foi colocada numa estufa a 80 °C, com o objetivo de reduzir o teor de humidade para abaixo dos 10%, condição necessária para a realização do ensaio.



Figura 7 - Aparelho Soxhlet e balão para extração do óleo da pasta de azeitona.

Dois balões foram previamente secos em estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, arrefecidos no exsiccador e tarados com precisão. A extração decorreu em duas fases consecutivas, cada uma com duração de 4 horas. Entre as fases, a amostra foi retirada, triturada finamente num moinho ou com auxílio de areia em almofariz, e novamente embrulhada no cartucho de papel de filtro para nova extração, reutilizando o mesmo balão.

Após a extração, o solvente foi eliminado por evaporação e os balões foram novamente colocados na estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Seguiu-se o arrefecimento em exsiccador e a pesagem. A secagem e pesagem repetiram-se até que a diferença entre duas pesagens consecutivas não ultrapassasse 5 mg. A massa da gordura extraída foi assim determinada e utilizada no cálculo do teor de óleo (equação 2):

Equação 2

$$\% \text{óleo} = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

sendo m_o a massa da amostra analisada e m_l a massa de óleo extraído. O resultado foi expresso com uma casa decimal, e o método exigiu que a diferença entre determinações paralelas não excedesse 0,5 em valor absoluto, para garantir a repetibilidade.

3.3.1.3. Determinação da acidez livre

A acidez foi determinada segundo o método descrito no Anexo I do COI/T.20/Doc. nº 34 e no Regulamento CEE N.º 2568/91. A gordura previamente extraída foi pesada consoante o intervalo de acidez esperado: 10 g para amostras com acidez entre 0% e 2%, 2,5 g para valores entre 2% e 7,5%, e 0,5 g para amostras com valores superiores. A amostra foi dissolvida numa solução composta por éter etílico e etanol, numa proporção 1:1 em volume (entre 50 a 100 mL), à qual se adicionaram 2 a 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH.

A titulação foi realizada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até à viragem da coloração para carmim. Quando a solução apresentava turvação durante a titulação, adicionava-se mais solvente para assegurar a clareza da reação. O volume de base consumido foi anotado para cálculo da acidez, de acordo com a seguinte fórmula (equação 3):

Equação 3

$$\% \text{Acidez} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

em que V é o volume (em mL) de NaOH utilizado, c a concentração da base titulante, M a massa molar do ácido oleico (282 g/mol), e m o peso da amostra (g). A acidez foi expressa com duas casas decimais para valores entre 0% e 1% e com uma casa decimal para valores superiores.

3.3.1.4. Método por NIR (Near Infrared)

Em alternativa ao método de extração, foi também utilizado um analisador automático baseado em tecnologia NIR para determinar os teores de água, óleo e acidez diretamente na pasta de azeitona. Utilizou-se o equipamento FoodScan (modelo OliveScan), da marca Foss, concebido especificamente para análise de azeitona (Figura 8).

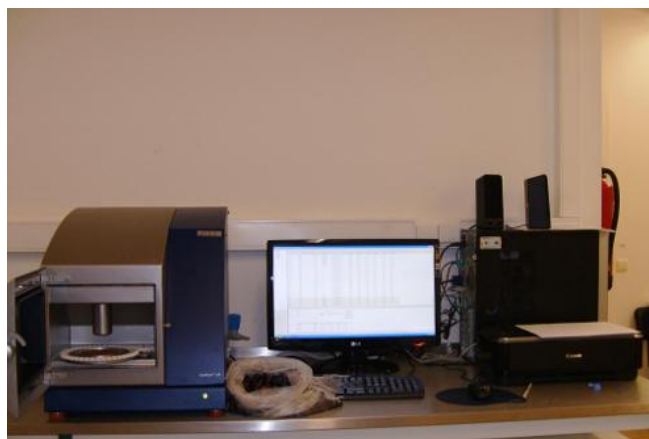


Figura 8 - Equipamento NIR para determinação do teor de água, óleo e acidez na pasta de azeitona.

A pasta de azeitona foi previamente moída com crivo de 3 a 4 mm e homogeneizada. Uma porção da amostra foi colocada na célula do equipamento (Figura 9), a qual foi submetida a rotação automática, permitindo medições em diferentes pontos. A luz proveniente da fonte radiante atravessa a amostra por meio de um sistema de lentes e fibras óticas, sendo que a luz não absorvida é captada por um detetor. O sinal é processado e transmitido para o computador, onde os valores são calculados com base em curvas de calibração previamente estabelecidas.



Figura 9 - Analisador automático para determinação de percentagem de gordura, humidade e acidez em pasta de azeitona

Este método, de natureza não destrutiva, apresenta a vantagem de permitir resultados imediatos, com elevada reprodutibilidade, sendo adequado para análise de um elevado número de amostras com rapidez.

3.3.1.5. Considerações finais sobre os métodos

A combinação dos métodos analíticos clássicos como a gravimetria e a extração por Soxhlet com tecnologias de análise instrumental, como o NIR, permitiu uma avaliação completa e eficaz da composição da azeitona. Enquanto os métodos de referência garantem o rigor necessário para a validação dos resultados, o NIR oferece rapidez e consistência, sendo particularmente vantajoso em contextos de elevado número de amostras ou ensaios de rotina. O uso de ambas as abordagens asseguram que os resultados obtidos ao longo da campanha sejam tecnicamente sólidos, fiáveis e comparáveis com outras investigações realizadas no mesmo âmbito.

4. Resultados

As amostras foram avaliadas em três momentos distintos entre outubro, novembro e dezembro de 2024, com o objetivo de quantificar a incidência de antracnose, o impacto da mosca da oliveira, e os parâmetros de qualidade dos frutos e azeite. Assim, foram analisados a incidência da doença, percentagem de frutos perfurados, peso e humidade dos frutos, teor de azeite e acidez do azeite produzido, além da precipitação e do esforço de trabalho envolvido.

4.1. Evolução da Antracnose

A evolução temporal da antracnose ao longo da campanha de 2024 demonstrou uma intensificação progressiva da doença (Quadro 1), acompanhando a maturação dos frutos. No início de outubro, a incidência era praticamente residual, com valores médios de apenas 2 frutos infetados em 50 (4%). Contudo, à medida que a campanha avançou, verificou-se um aumento consistente. O pico ocorreu em dezembro, com 23 frutos infetados em 50 (46%), refletindo a elevada incidência do patógeno nesta fase tardia da maturação. Esta incidência do patógeno não se limitou aos frutos, estendendo-se também às folhas e aos ramos da oliveira (Figura 10).

Estes resultados confirmam a natureza cumulativa da antracnose, cuja incidência tende a intensificar-se no outono, em condições favoráveis de humidade e temperatura.



Figura 10 - Ramos afetados pela antracnose em dezembro onde se observa desfoliação intensa.

Quadro 1 - Evolução da antracnose ao longo das datas de amostragem nas diferentes herdades.

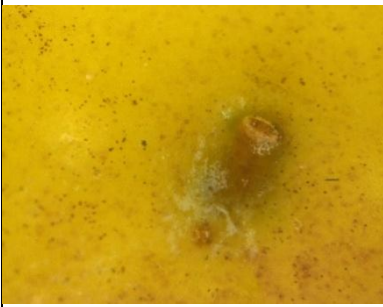
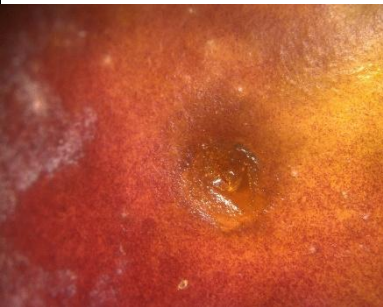
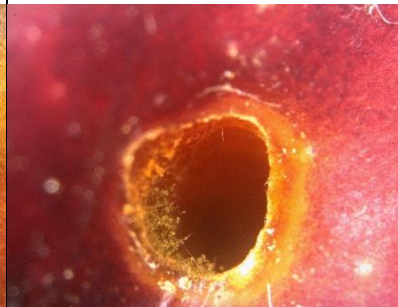
	outubro	Novembro	dezembro
Sousa			
Farrobo			
Monte espada			

Nas parcelas avaliadas, verificou-se que, ao longo do período de observação, houve um incremento progressivo na severidade dos sintomas nas plantas. Esse fenômeno foi particularmente evidente na parcela Sousa, onde as lesões apresentaram maior expansão e registrou-se também elevação na incidência de frutos com sinais de necrose. No Monte Espada, observou-se igualmente uma intensificação gradativa dos sintomas, embora em menor magnitude quando comparado à parcela Sousa. Já em Farrobo, o agravamento dos sintomas ocorreu de forma mais moderada, indicando uma progressão menos acentuada da doença nessa área.

4.2. Avaliação dos estragos da mosca da azeitona

A presença da mosca da azeitona (*B. oleae*) acompanhou, em certa medida, esta evolução. Em outubro, os valores foram baixos (1,5 a 4 frutos com picadas), mas em dezembro já se registavam mais de 10 frutos em média com perfurações, correspondendo a cerca de 20% de frutos danificados. Embora a percentagem de frutos perfurados tenha permanecido relativamente inferior à da antracnose, a sua contribuição para a degradação da qualidade não pode ser desvalorizada, uma vez que a existência de feridas de alimentação potencia a entrada de patógenos, podendo agravar a severidade da doença (Quadro 2).

Quadro 2 - Orifícios de oviposição e de saída da larva

Orifício representativo da oviposição	Orifício representativo da oviposição	Orifício de saída da mosca adulta
		

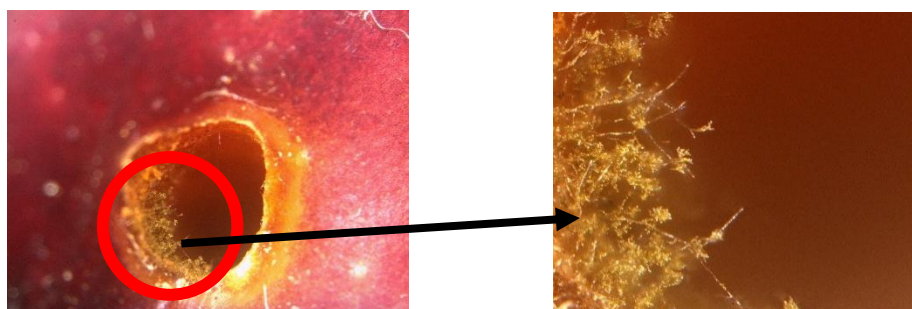


Figura 11 - Micélio de fungo na sequência dos estragos provocados pela mosca da azeitona.

Como se pode observar na Figura 11, imagem da esquerda evidencia o orifício de saída deixado pela larva da mosca da azeitona (*B. oleae*) na epiderme do fruto. Esta perfuração constitui uma porta de entrada natural para diferentes microrganismos,

favorecendo a instalação de infecções secundárias. A ampliação apresentada na imagem da direita ilustra a presença de micélios fúngicos desenvolvendo-se a partir desse mesmo orifício.

Este processo demonstra a estreita relação entre o ataque da mosca da azeitona e o desenvolvimento de doenças fúngicas, uma vez que as lesões causadas pela praga comprometem a integridade da epiderme e do mesocarpo, criando condições favoráveis à colonização por fungos patogénicos. Assim, a interação entre praga e patógeno tem impacto direto na qualidade do fruto e, consequentemente, na qualidade do azeite produzido.

4.3. Condições climáticas

Entre as variáveis analisadas, destacam-se a temperatura média, que é fundamental para acompanhar o amadurecimento do fruto e prevenir danos causados por geadas. A humidade relativa é outro parâmetro relevante, pois influencia o desenvolvimento de doenças como o olho-de-pavão ou a gafa, que podem afetar significativamente a produção. A precipitação acumulada é essencial para avaliar se ocorreram períodos de seca ou de excesso de chuva que poderiam interferir tanto com o estado sanitário do olival como com o acesso ao terreno para efeitos de colheita.

Tendo em conta que a campanha de colheita da azeitona decorre normalmente entre os meses de outubro e janeiro, as condições climáticas durante este período têm um papel determinante na definição da quantidade e qualidade da produção. Chuvas intensas ou prolongadas podem atrasar a colheita e dificultar a entrada no olival. Temperaturas moderadas favorecem a estabilidade e a qualidade do fruto, enquanto eventos extremos, como geadas ou ventos fortes, podem comprometer o rendimento final.

Este tipo de análise meteorológica é, por isso, uma ferramenta importante para o planeamento agrícola e para a tomada de decisões técnicas relacionadas com a colheita e a gestão do olival.

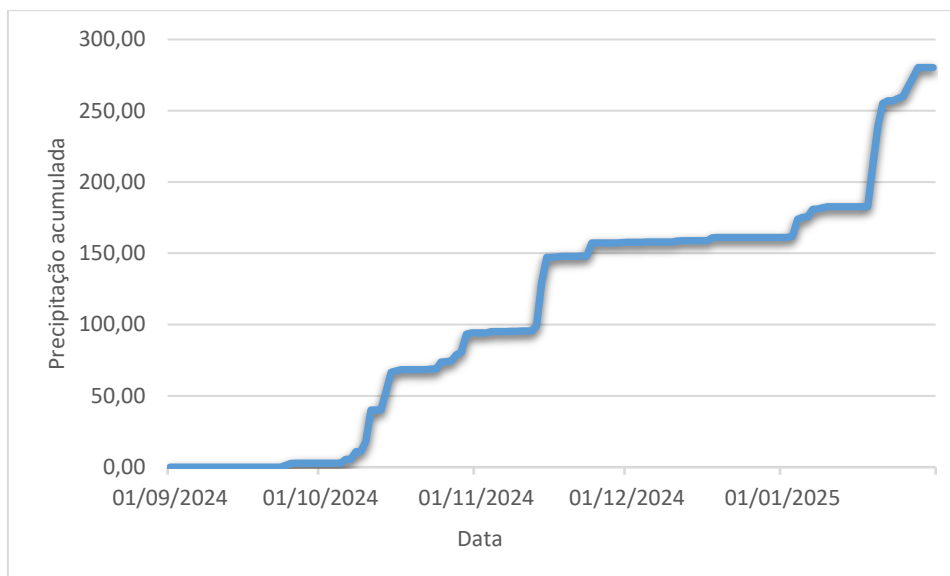


Figura 12 - Precipitação acumulada durante o período de setembro 2024 a janeiro de 2025.

Durante o período em análise (Figura 12), a evolução da precipitação revelou padrões relevantes para a compreensão da dinâmica fitopatológica observada nas culturas. Em setembro, registou-se uma precipitação muito reduzida até ao dia 24, data a partir da qual se iniciou uma ligeira acumulação (1,2 mm). Em outubro, verificou-se um crescimento mais acentuado da precipitação a partir do dia 7, destacando-se episódios intensos nos dias 11 (7,2 mm), 12 (22 mm), 15 (12,7 mm) e 16 (13,7 mm), totalizando cerca de 94 mm no final do mês. Novembro manteve a tendência de precipitação significativa, com um pico expressivo a 15 de novembro (30,2 mm), seguido de um novo episódio importante no dia 25 (9,2 mm). Em dezembro, após um início seco, registaram-se precipitações dispersas de pequena intensidade, não ultrapassando os 5 mm diários. No final do ano, a precipitação total acumulada ascendia a aproximadamente 161,2 mm.

Estes dados meteorológicos são particularmente relevantes no contexto fitossanitário, uma vez que a precipitação desempenha um papel determinante na indução e propagação de doenças fúngicas, como a antracnose. O outono, caracterizado por um regime pluviométrico relativamente elevado, apresentou dois períodos críticos – meados de outubro e de novembro – que coincidem com os picos de incidência da doença observados nos dados de campo e de laboratório. Estas condições favoreceram significativamente o desenvolvimento e disseminação de infeções fúngicas nas culturas analisadas.

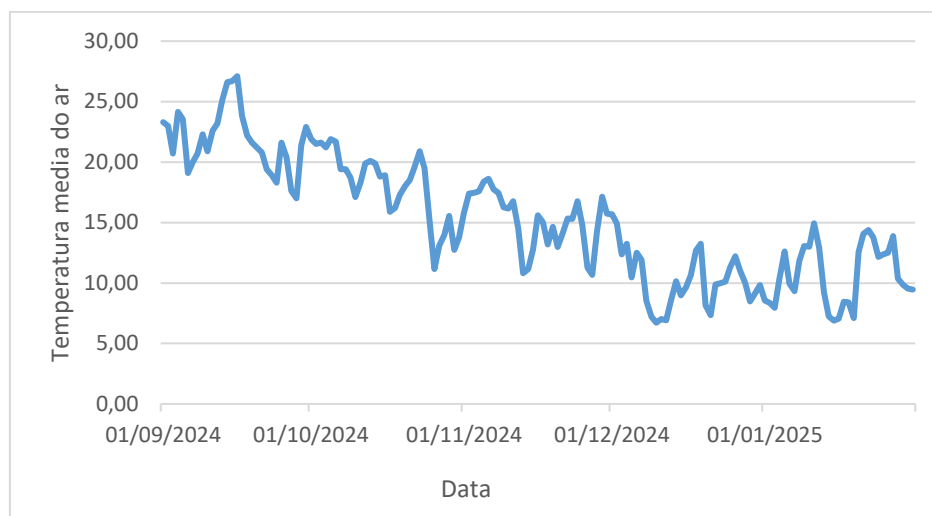


Figura 13 - Evolução da temperatura média diária no período de setembro 2024 a janeiro de 2025.

A análise da temperatura média diária entre os meses de setembro e outubro de 2024 (Figura 13), evidencia uma tendência clara de descida térmica progressiva, característica da transição sazonal do verão para o outono. Durante o mês de setembro, as temperaturas mantiveram-se elevadas, com valores médios acima dos 20 °C, atingindo pontualmente os 27 °C, especialmente a meio do mês. Esta fase foi marcada por condições favoráveis ao desenvolvimento vegetativo das culturas, com temperaturas ainda típicas do final do verão.

Com o avanço para outubro, observa-se uma transição térmica gradual. As temperaturas médias diárias começam a oscilar entre os 19 °C e os 23 °C, revelando um arrefecimento progressivo, ainda que pontualmente irregular. No final de outubro, regista-se uma descida mais acentuada, com médias que passam a situar-se entre os 12 °C e os 15 °C. Esta redução coincide com a ocorrência de episódios intensos de precipitação, sugerindo a entrada de frentes frias e o início de um padrão climático mais invernos.

A descida das temperaturas após os picos pluviométricos revela uma correlação entre as condições meteorológicas adversas (chuva e frio) e o avanço fenológico da cultura da oliveira. Estas alterações no regime térmico, particularmente quando abruptas, podem influenciar tanto o metabolismo da planta como a dinâmica de agentes patogénicos, nomeadamente os que favorecem a instalação de doenças fúngicas.

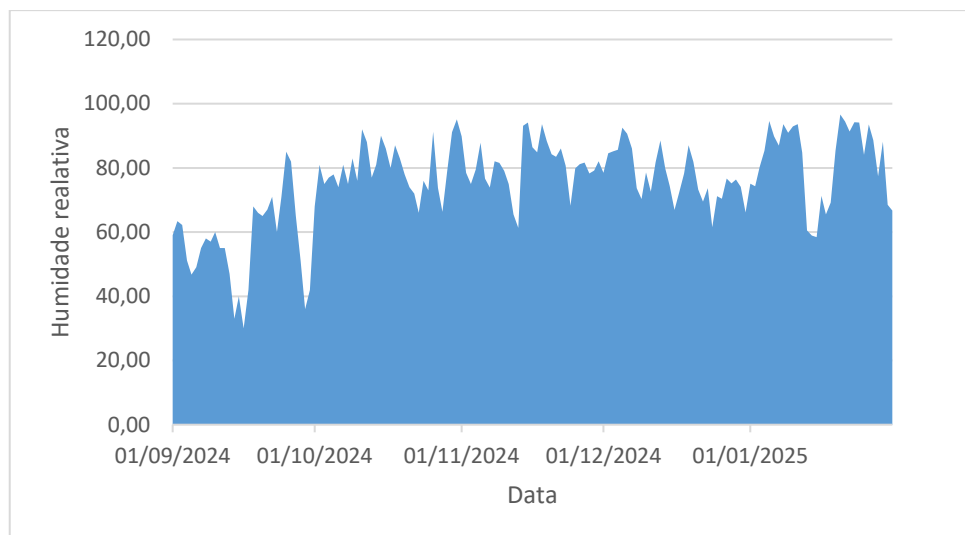


Figura 14 - Variação da umidade relativa durante o período de setembro 2024 a janeiro de 2025.

A umidade relativa do ar apresentou uma variação considerável durante o período compreendido entre setembro e outubro de 2024 (Figura 14), refletindo a influência direta das condições meteorológicas e da transição sazonal. No mês de setembro, os valores oscilaram entre 30% e 85%, com os níveis mais baixos registrados nos dias de maior temperatura, em que o ar se apresentava mais seco. Estas oscilações demonstram uma grande amplitude higrométrica, típica de finais de verão, com dias quentes e noites mais frescas.

Ao longo de outubro, verificou-se um aumento progressivo da umidade relativa, com uma estabilização gradual dos valores. A partir da segunda quinzena, os níveis mantiveram-se persistentemente acima dos 70%, coincidindo com a ocorrência de episódios de precipitação e com a descida das temperaturas médias. Durante este período, destacam-se picos de umidade superiores a 90%, diretamente associados a eventos pluviométricos intensos, como no dia 31 de outubro, quando se registraram 92%.

No final do mês de outubro, a umidade relativa apresentou-se consistentemente elevada, com médias superiores a 75%. Este cenário criou um ambiente microclimático extremamente favorável à proliferação de doenças fúngicas, como a antracnose, cuja instalação e progressão estão fortemente dependentes de condições de elevada umidade e temperatura moderada. A persistência destes valores reforça a importância do monitoramento e na previsão de riscos fitossanitários em olivais.

4.4. Análise estatística

4.4.1. Matriz de correlação

Quadro 3 - Matriz de correlação entre as variáveis incidência de antracnose, incidência de mosca, teor de água, peso de 50 frutos, teor de óleo na matéria seca e acidez.

Matriz de Correlações		Incidência de antracnose	Incidência de mosca	Teor de água no fruto (%)	Peso de 50 frutos (g)	Teor de óleo Ps (%)	Acidez (%)
Incidência de antracnose	R de Pearson	—					
	gl	—					
	p-value	—					
Incidência de mosca	R de Pearson	0.562 *	—				
	gl	16	—				
	p-value	0.015	—				
Teor de água no fruto (%)	R de Pearson	-0.620 **	-0.374	—			
	gl	16	16	—			
	p-value	0.006	0.126	—			
Peso de 50 frutos (g)	R de Pearson	-0.271	-0.073	0.586 *	—		
	gl	16	16	16	—		
	p-value	0.276	0.775	0.011	—		
Teor de óleo Ps (%)	R de Pearson	0.568 *	0.221	-0.143	-0.283	—	
	gl	16	16	16	16	—	
	p-value	0.014	0.379	0.570	0.255	—	
Acidez (%)	R de Pearson	0.875 ***	0.519 *	-0.870 ***	-0.574 *	0.437	—
	gl	16	16	16	16	16	—
	p-value	< .001	0.027	< .001	0.013	0.070	—

Nota. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

A análise de correlação (Quadro 3), mostra que algumas variáveis estão mais diretamente relacionadas entre si e exercem maior influência no comportamento dos frutos. A acidez destaca-se como a característica central, pois apresenta as correlações mais fortes. Frutos mais ácidos tendem a ter menor teor de água e também menor peso, além de apresentarem maior incidência tanto de antracnose como de mosca.

O teor de água, por sua vez, está diretamente associado ao peso dos frutos, o que faz sentido, já que frutos mais pesados tendem a conter mais água. No entanto, observa-se que frutos menos afetados pela antracnose tendem a ter mais água e são menos ácidos.

A antracnose apresenta ainda uma relação importante com o teor de óleo no peso seco, indicando que frutos afetados tendem a ter uma alteração nesse parâmetro, o que pode refletir modificações metabólicas causadas pela doença. Já a mosca, embora não apresente tantas correlações fortes, também está relacionada com a acidez, reforçando o papel dessa variável como determinante na qualidade e sanidade dos frutos.

4.4.2. ANOVA não paramétrica

Quadro 4 – Anova não paramétrica (Kruskal-Wallis) para comparação das datas de colheita.

Kruskal-Wallis			
	χ^2	df	p
Incidência de antracnose	10.9	2	0.004

Pairwise comparisons - Incidência de antracnose			
		W	p
1	2	3.53	0.034
1	3	4.08	0.011
2	3	1.82	0.401

Quadro 5 – Anova não paramétrica para comparação da incidência de antracnose nos diferentes pomares experimentais

Kruskal-Wallis			
	χ^2	df	p
Incidência de antracnose	3.37	2	0.185

Inicialmente, foi realizada uma ANOVA não paramétrica, uma vez que os pressupostos necessários para a aplicação da ANOVA paramétrica não foram cumpridos. Na primeira análise, avaliou-se a evolução do nível de antracnose ao longo das diferentes datas de observação (Quadro 4). Verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a segunda data ($p \leq 0,05$), bem como entre a primeira e a terceira data ($p \leq 0,05$). Contudo, não se observaram diferenças significativas entre a segunda e a terceira data ($p > 0,05$).

Adicionalmente, procedeu-se à análise comparativa entre as parcelas em estudo (Quadro 5), também através de uma ANOVA não paramétrica. Neste caso, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as parcelas ($p > 0,05$).

4.5. Evolução da Antracnose e parâmetros de qualidade dos frutos

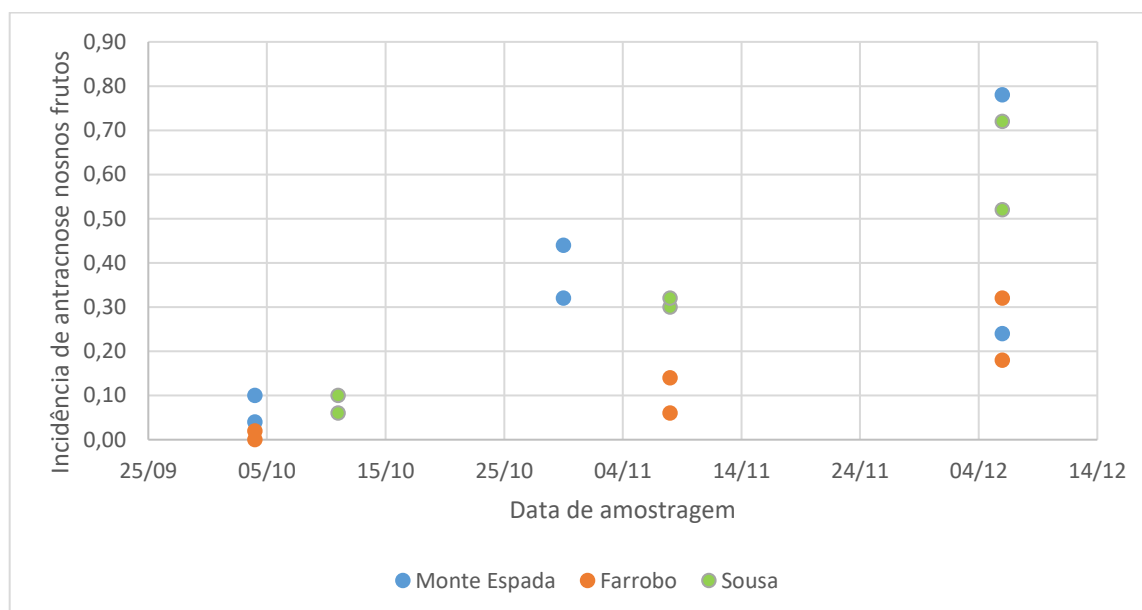


Figura 15 - Incidência de antracnose nos frutos para as diferentes datas de amostragem nos três pomares experimentais.

A Figura 15 representa a incidência de Antracnose/gafa nos frutos evidenciando a evolução da doença nos três locais analisados (Monte Espada, Farrobo e Sousa). Em todos eles observa-se uma tendência crescente ao longo do tempo, embora com pequenas diferenças na intensidade registrada em cada parcela. Esta evolução paralela sugere que os fatores ambientais (como a precipitação, a temperatura e a humidade relativa) tiveram um impacto determinante, condicionando de forma semelhante a progressão da doença em todos os locais. Assim, pode concluir-se que a presença da Antracnose não esteve limitada a uma localização específica, mas sim generalizada, acompanhando as condições que favoreceram o desenvolvimento do fungo.

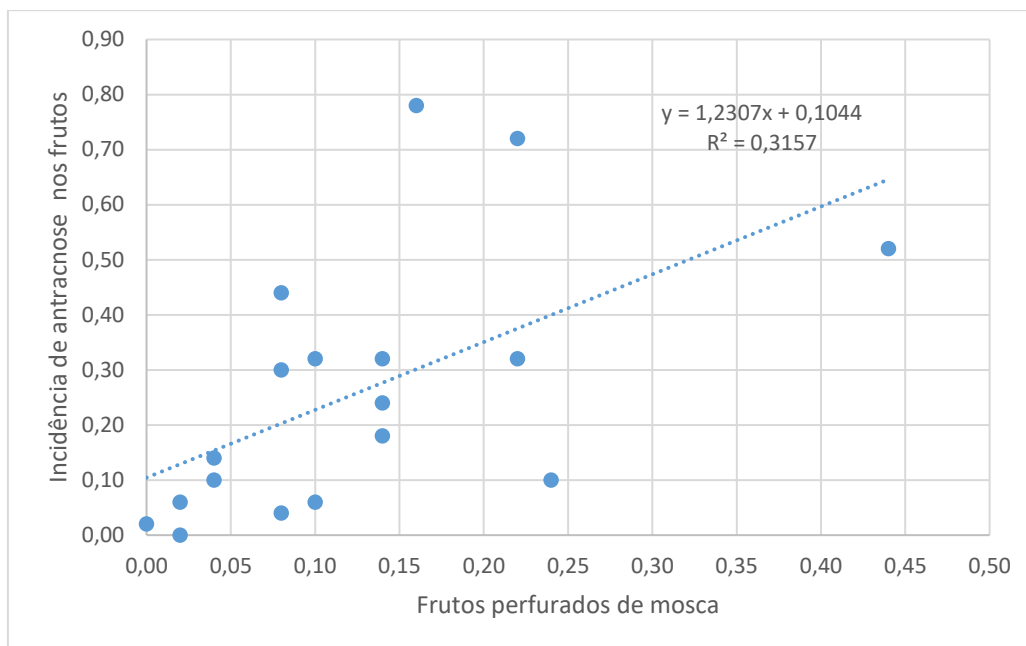


Figura 16 - Relação entre a fração de frutos perfurados e incidência de antracnose nos mesmos frutos.

Na Figura 16, onde é comparada a interação entre os frutos perfurado pela mosca e a incidência de antracnose no fruto, a maioria das observações apresenta valores relativamente baixos, indicando uma situação inicial controlada. No entanto, a ocorrência de um pico elevado nas últimas datas de registo demonstra que, em determinados momentos, a doença pode manifestar-se de forma mais intensa. Este resultado é consistente com a ideia de que, numa fase avançada do ciclo do fruto, a suscetibilidade pode aumentar ou que determinadas condições ambientais podem ter proporcionado um surto repentino da doença. Esta constatação sublinha a importância de um acompanhamento contínuo, uma vez que uma evolução aparentemente lenta pode, em pouco tempo, resultar em níveis de incidência prejudiciais à produção.

A Correlação entre praga e doença mostra uma associação positiva entre a percentagem de frutos perfurados e a incidência da doença. Ou seja, sempre que o número de frutos perfurados aumenta, verifica-se também um incremento da incidência da doença. Este resultado sugere uma interação entre fatores bióticos, em que a praga pode facilitar a entrada e instalação do agente patogénico. Do ponto de vista prático, este resultado destaca a importância de um controlo integrado, dado que a gestão da praga poderá ter reflexos diretos na redução da incidência da doença, atuando de forma preventiva.

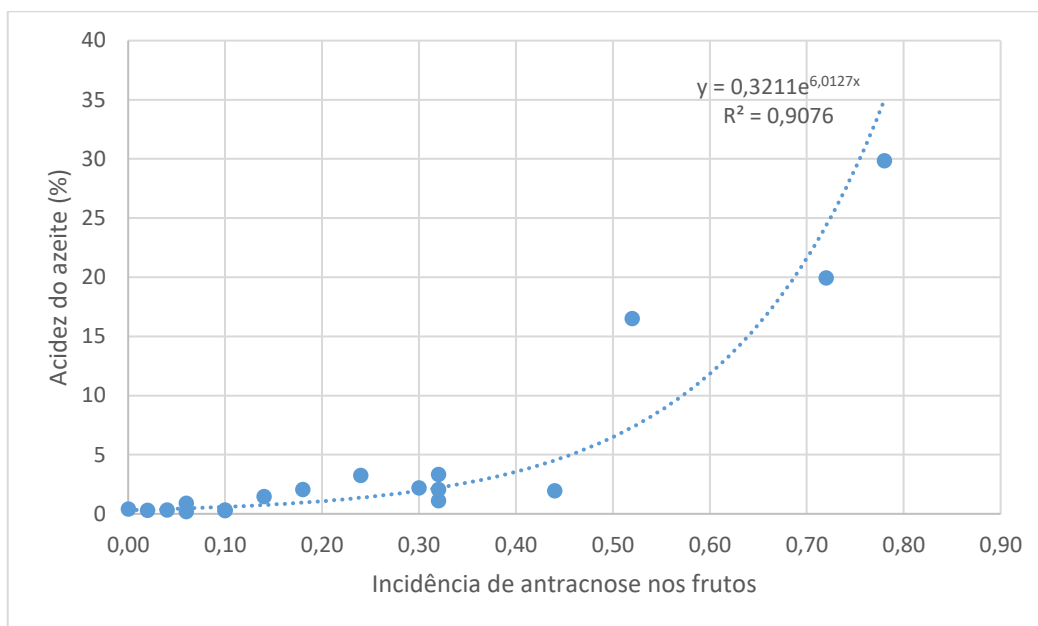


Figura 17 - Relação entre a incidência de antracnose e o teor de acidez medido no azeite.

A relação entre a incidência de antracnose nos frutos e a acidez do azeite encontra-se representada na Figura 17. Verifica-se uma associação exponencial positiva significativa ($p < 0,05$) entre as duas variáveis ($R^2 = 0,9076$), evidenciando que mesmo baixos níveis de infecção têm impacto direto na qualidade do azeite.

5. Discussão

A antracnose da oliveira, causada por diferentes espécies do género *Colletotrichum spp.*, constitui uma das doenças mais relevantes e limitantes da olivicultura em regiões de clima mediterrânico. Diversos autores (Loureiro et al., 2018; Peres et al., 2021; Talhinhos et al., 2005) referem que a doença não só compromete a produtividade dos olivais como também afeta de forma decisiva a qualidade do azeite produzido, colocando em causa a sua valorização comercial.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram esta visão, evidenciando que a antracnose é um fator determinante na depreciação qualitativa do azeite. Ao longo do período de observação, entre outubro de 2024 e janeiro de 2025, verificou-se uma evolução temporal marcada da doença, com intensificação progressiva da sua incidência. Esta dinâmica encontra-se em conformidade com o descrito por Moral et al. (Moral et al., 2014), que identificam o outono húmido como a estação mais propícia para a manifestação sintomática da antracnose. Assim, este período do ciclo anual da oliveira constitui um momento crítico para a sanidade da cultura e para a qualidade do produto final.

A metodologia adotada neste trabalho, baseada em amostragens sequenciais em diferentes herdades e em análises laboratoriais dos parâmetros físico-químicos do azeite, permitiu estabelecer uma associação direta entre a severidade da antracnose e as alterações na qualidade do produto. Os resultados demonstraram que existe uma relação exponencial entre a intensidade da doença e a acidez do azeite, confirmando os trabalhos pioneiros de Carvalho et al. e Iannotta et al. (Carvalho et al., 2008; Iannotta et al., 1999). Estes autores já haviam evidenciado que mesmo níveis relativamente baixos de infeção são suficientes para comprometer a classificação comercial do azeite. Na presente investigação, verificou-se que o aumento da incidência da doença se repercutiu em elevações significativas da acidez, inviabilizando a certificação de azeites como virgem extra. Estes dados corroboram ainda os achados de Runcio et al. (Runcio et al., 2008), que demonstraram que infeções fúngicas provocadas por *Colletotrichum* alteram de forma relevante não apenas o perfil químico, mas também o perfil organolético do azeite, reduzindo a sua qualidade sensorial e o seu valor comercial.

Um aspeto particularmente relevante observado neste estudo foi a interação entre a antracnose e a mosca da azeitona (*B. oleae*). Os frutos que apresentavam perfurações devido à praga mostraram-se mais suscetíveis à infeção fúngica, revelando uma correlação positiva entre os dois fatores. Tal resultado confirma as observações reportadas por Loureiro et al. e por Daane & Johnson (Daane & Johnson, 2010; Loureiro et al., 2018), que descreveram a

praga como um facilitador da penetração do patógeno. Esta constatação reforça a necessidade de uma abordagem integrada no manejo da oliveira, em que o controlo de *B. oleae* contribui indiretamente para a redução da severidade da antracnose. Desta forma, evidencia-se a importância do conceito de proteção integrada, onde a interação entre pragas e doenças deve ser considerada de forma holística, permitindo intervenções mais eficazes e sustentáveis.

As condições climáticas registadas durante o período de ensaio (temperatura média de 15,2 °C, elevada humidade relativa e precipitação acumulada de 280,3 mm) foram particularmente favoráveis ao desenvolvimento da doença. Estes resultados alinham-se com os trabalhos de Talhinhos et al. e Moral et al. (Moral et al., 2014; Talhinhos et al., 2005), que destacam a conjugação de temperaturas amenas e elevados níveis de humidade como fatores críticos para a infeção e disseminação de *Colletotrichum spp.*. Tal evidência reforça a pertinência de considerar a previsão meteorológica como ferramenta de apoio à decisão no planeamento da colheita. Estratégias de colheita ajustadas ao risco climático podem contribuir para mitigar os impactos da antracnose, sobretudo em anos com outonos particularmente húmidos.

De forma convergente com a literatura (Moral et al., 2014; Peres et al., 2021) os resultados obtidos evidenciam que a antracnose não compromete apenas a produtividade da cultura, devido à queda precoce dos frutos, mas também exerce um efeito negativo expressivo na qualidade do azeite. Este impacto verifica-se não só através do aumento da acidez, mas também pela redução da estabilidade oxidativa e pela degradação dos compostos fenólicos. Tais parâmetros são cruciais para a valorização comercial e nutricional do azeite, uma vez que os compostos fenólicos contribuem para as propriedades antioxidantes e para o perfil sensorial do produto. A severidade destes efeitos foi particularmente notória na parcela Sousa, onde a intensidade dos sintomas foi mais elevada. Este resultado sugere que fatores locais, como o microclima ou o manejo cultural, podem acentuar a suscetibilidade da oliveira à doença, confirmando a importância de considerar a variabilidade intra-regional na definição de estratégias de controlo.

Neste sentido, o presente trabalho reforça a evidência de que a antracnose deve ser considerada não apenas como uma doença de impacto agronómico, mas também de elevada relevância tecnológica e comercial. Os resultados obtidos mostram que a colheita precoce constitui uma das estratégias mais eficazes para preservar a qualidade do azeite, em linha com as recomendações de Carvalho et al. e Moral et al. (Carvalho et al., 2008; Moral et al., 2014). Constatou-se que, para garantir um nível de acidez inferior a 0,5%, valor de referência

para azeites virgem extra de elevada qualidade, a incidência da antracnose não pode ultrapassar os 5 a 7% dos frutos nos pomares. Da mesma forma, para que a acidez se mantenha abaixo de 1%, a incidência da doença deve permanecer inferior a 20%. Acima destes limiares, a acidez aumenta rapidamente, ultrapassando os limites que definem a categoria virgem extra ($<0,8\%$) e mesmo a categoria virgem ($0,8-2\%$). Nessas circunstâncias, o azeite passa a ser classificado como lampante ($>2\%$), impróprio para consumo direto, o que representa uma perda significativa do seu valor comercial.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo corroboram a literatura existente ao demonstrar que a progressão da antracnose conduz inevitavelmente ao aumento da acidez e à degradação da qualidade do azeite (Carvalho et al., 2008; Iannotta et al., 1999; Moral et al., 2014; Peres et al., 2021; Runcio et al., 2008). Ao mesmo tempo, destacam a importância de estratégias preventivas, como a colheita precoce e o manejo integrado de pragas, na mitigação dos impactos da doença. Dada a forte dependência da incidência da antracnose em relação às condições climáticas, a integração de ferramentas de previsão meteorológica no processo de tomada de decisão assume-se como elemento-chave para assegurar a sustentabilidade da produção olivícola e a manutenção da qualidade do azeite na região mediterrânica.

6. Conclusão

O presente trabalho permitiu avaliar de forma detalhada a influência da antracnose da oliveira (*Colletotrichum* spp.) na qualidade do azeite produzido em diferentes pomares do Alentejo, evidenciando a relevância desta doença como um dos principais fatores limitantes da olivicultura mediterrânica.

Através de amostragens sucessivas ao longo da campanha de 2024 e da análise de parâmetros físico-químicos, ficou demonstrado que a incidência da antracnose aumenta progressivamente durante o outono, acompanhando a maturação dos frutos e sendo fortemente condicionada por fatores ambientais, nomeadamente a humidade relativa elevada e as temperaturas amenas. Os resultados mostraram uma relação exponencial entre a incidência da doença e a acidez do azeite, confirmando que mesmo níveis relativamente baixos de infeção (5–7%) são suficientes para comprometer a classificação comercial do azeite virgem extra (<0,8% de acidez). Quando a incidência ultrapassa os 20%, a acidez tende a superar 1%, conduzindo rapidamente à desvalorização do azeite para categorias inferiores, e em muitos casos para azeite lampante (>2%).

Outro aspeto relevante foi a interação entre a antracnose e a mosca da azeitona (*B. oleae*). Observou-se uma correlação positiva entre os frutos perfurados pela praga e a incidência da doença, o que reforça a importância de um controlo integrado que considere simultaneamente pragas e patógenos como elementos interligados no impacto final sobre a produção e a qualidade.

Do ponto de vista prático, os resultados sublinham a necessidade de adotar estratégias de manejo que incluam a monitorização rigorosa da doença, a escolha adequada do momento de colheita e o controlo da mosca da azeitona como medidas preventivas. A antecipação da colheita revelou-se uma das soluções mais eficazes para reduzir o impacto da antracnose, evitando que a incidência atinja níveis críticos capazes de comprometer a qualidade do azeite.

Em síntese, esta investigação confirma que a antracnose deve ser considerada não apenas como um problema fitossanitário, mas também como um fator determinante para a qualidade tecnológica e comercial do azeite. A integração dos resultados obtidos com a literatura existente contribui para reforçar a importância da gestão integrada da doença e abre perspectivas para futuras investigações focadas em técnicas de previsão baseadas em modelos climáticos, seleção de cultivares menos suscetíveis e estratégias de controlo mais sustentáveis.

As perspectivas futuras decorrentes deste trabalho apontam para a necessidade de aprofundar o estudo da antracnose da oliveira e do seu impacto na qualidade do azeite, através do desenvolvimento de modelos de previsão da doença baseados em dados climáticos, capazes de apoiar a tomada de decisão no campo. Torna-se igualmente essencial implementar programas de monitorização contínua da incidência da antracnose, de forma a permitir uma avaliação mais rigorosa da evolução da doença ao longo da campanha e em diferentes regiões. A seleção e ensaio de cultivares com maior tolerância ao patógeno constituem também uma linha de investigação prioritária, uma vez que podem contribuir para a redução da suscetibilidade dos olivais. Paralelamente, importa avaliar alternativas de controlo mais sustentáveis, que reduzam a atual dependência de fungicidas cúpricos, tendo em conta as crescentes preocupações ambientais e regulamentares. Assim, os resultados obtidos nesta dissertação não apenas permitem compreender melhor os mecanismos através dos quais a antracnose compromete a qualidade do azeite, mas também fornecem orientações relevantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes, sustentáveis e ajustadas à realidade dos olivais mediterrânicos.

7. Referências Bibliográficas

- Ameida, J. V. (1899). *La Gaffa des olives en Portugal*.
<https://repositorio.ulisboa.pt/bitstream/10400.5/13266/1/Bulletin%20-%20bulletin15soci.pdf>
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S. A., Le Floch, G., & Thon, M. R. (2017). The *Colletotrichum acutatum* Species Complex as a Model System to Study Evolution and Host Specialization in Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02001>
- Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., & Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: From Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122833. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2833>
- 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.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.85>
- Chacko, R. J., Weidemann, G. J., Tebeest, D. O., & Correll, J. C. (1994). The Use of Vegetative Compatibility and Heterokaryosis to Determine Potential Asexual Gene Exchange in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biological Control*, 4(4), 382–389.
<https://doi.org/10.1006/bcon.1994.1048>

- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annual Review of Entomology*, 55(Volume 55, 2010), 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- De Caraffa, B. V., Maury, J., Gambotti, C., Breton, C., Bervillé, A., & Giannettini, J. (2002). Mitochondrial DNA variation and RAPD mark oleasters, olive and feral olive from Western and Eastern Mediterranean. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6), 1209–1216. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0883-7>
- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- Diego, B. N., RICARDO, F. E., & LUIS, R. R. (2017). *El cultivo del olivo 7ª ed.* Ediciones Mundi-Prensa.
- Famiani, F., Proietti, P., & Tombesi, A. (2001). *Oil quality in relation to olive ripening*. <https://research.unipg.it/handle/11391/919702>
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., & Cichelli, A. (2008). Effects of Fly Attack (*Bactrocera oleae*) on the Phenolic Profile and Selected Chemical Parameters of Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4577–4583. <https://doi.org/10.1021/jf800118t>
- Gómez-Coca, R. B., Moreda, W., & Pérez-Camino, M. C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135(3), 1205–1209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.053>
- Gucci, R., Caruso, G., Canale, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., Taticchi, A., Esposto, S., & Servili, M. (2012). Qualitative Changes of Olive Oils Obtained from Fruits

- Damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *HortScience*, 47(2), 301–306.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.47.2.301>
- 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.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.474.118>
- Johnston, P. R., & Jones, D. (1997). Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*, 89(3), 420–430.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026801>
- 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), Artigo spe.
<https://doi.org/10.19084/rca.17073>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.009>
- Moral, J., Alsalimiya, M., Roca, L. F., Díez, C. M., León, L., de la Rosa, R., Barranco, D., Rallo, L., & Trapero, A. (2015). Relative Susceptibility of New Olive Cultivars to *Spilocaea oleagina*, *Colletotrichum acutatum*, and *Pseudocercospora cladosporioides*. *Plant Disease*, 99(1), 58–64. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0355-RE>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-5-0548>

- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0343>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0344>
- Moral, J., Xaviér, C. J., Viruega, J. R., Roca, L. F., Caballero, J., & Trapero, A. (2017). Variability in Susceptibility to Anthracnose in the World Collection of Olive Cultivars of Cordoba (Spain). *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01892>
- Moral, J., Xaviér, C., Roca, L. F., Romero, J., Moreda, W., & Trapero, A. (2014). Olive Anthracnose and its effect on oil quality. *Grasas y Aceites*, 65(2), Artículo 2. <https://doi.org/10.3989/gya.110913>
- Mosca, S., Nicosia, M. G. L. D., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2014). Molecular Analysis of *Colletotrichum* Species in the Carposphere and Phyllosphere of Olive. *PLOS ONE*, 9(12), e114031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114031>
- Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S., & Bouaziz, M. (2010). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3235–3241. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.031>
- Peres, F., Gouveia, C., Vitorino, C., Oliveira, H., & Ferreira-Dias, S. (2024). How the “Olive Oil Polyphenols” Health Claim Depends on Anthracnose and Olive Fly on Fruits. *Foods*, 13(11), 1734. <https://doi.org/10.3390/foods13111734>

- 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), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061041>
- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E., & Correll, J. C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89(8), 784–796. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0784>
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., & Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2), 186–198. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Rallo, L., Ministerio de Agricultura, P. y A., Barranco, D., Caballero, J. M., Del Rio, C., Martin, A., Tous, J., & Trujillo, I. (2005). *Variedades de olivo en Espana*. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122621/records/647396863ed73003714cc95b>
- Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R., & Altamura, M. M. (2005). OLIVE (OLEA EUROPAEA L.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 345–360.
- 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 anthracnose attack. *Food Chemistry*, 106(2), 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.051>
- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S. O., Faedda, R., Sanzani, S. M., Agosteo, G. E., Sergeeva, V., & 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12110>

- Sergeeva, V. (2011). *ANTHRACNOSE IN OLIVES: SYMPTOMS, DISEASE CYCLE AND MANAGEMENT*.
- Sergeeva, V., Spooner-Hart, R., & Nair, N. G. (2008). First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing leaf spots of olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 3(1), 143–144. <https://doi.org/10.1007/BF03211271>
- 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(1), 73–83. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0590-7>
- Talhinhas, P., Mota-Capitão, C., Martins, S., Ramos, A. P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., Silva, M. C., Sreenivasaprasad, S., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02397.x>
- 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. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.71.6.2987-2998.2005>
- Tamendjari, A., Angerosa, F., Mettouchi, S., & Bellal, M. M. (2009). The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of *Chemlal* olive oil. *Grasas y Aceites*, 60(5), 509–515. <https://doi.org/10.3989/gya.032209>

- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6564–6571. <https://doi.org/10.1021/jf030268k>
- von Arx, J. A. (1957). *Mycosphaerella Joerstadii* auf *Rubus chamaemorus*. *Acta Botanica Neerlandica*, 6(3), 337–340.
- Wharton, P. S., & Diéguez-Urbeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1), Artículo 1. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>
- Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of Fruit Growing in the Old World. *Science*, 187(4174), 319–327. <https://doi.org/10.1126/science.187.4174.319>

Apêndice 1 - Dados amostrais

Data	Parcela	Amostra	Cultivar	Antracnose 50 frutos	Incidência nos frutos (%)	Mosca 50 frutos	Frutos perfurados (%)	Peso 50 frutos	Alternária	Humidade (%)	Azeite no peso fresco (%)	Azeite na matéria seca (%)	Acidez (%)
04/10/2024	Monte Espada	1	Arbequina	2	0,04	4	0,08	73,5		59,79	12,85	31,96	0,32
04/10/2024	Monte Espada	2	Arbequina	5	0,10	12	0,24	108,41	Sim	59,18	12,95	31,72	0,32
30/10/2024	Monte Espada	1	Arbequina	16	0,32	11	0,22	80,27		63,61	14,91	40,97	1,1
30/10/2024	Monte Espada	2	Arbequina	22	0,44	4	0,08	108,55		67,56	12,51	38,56	1,96
06/12/2024	Monte Espada	1	Arbequina	12	0,24	7	0,14	78,01		62,21	16,96	44,88	3,26
06/12/2024	Monte Espada	2	Arbequina	39	0,78	8	0,16	48,85		41,28	25,32	43,12	29,85
04/10/2024	Farrobo	1	Arbequina	1	0,02	0	0,00	60,66		57,76	15,99	37,86	0,30
04/10/2024	Farrobo	2	Arbequina	0	0,00	1	0,02	61,83		63,75	13,38	36,91	0,40
08/11/2024	Farrobo	1	Arbequina	3	0,06	5	0,10	82,27		64,95	14,23	40,6	0,9
08/11/2024	Farrobo	2	Arbequina	7	0,14	2	0,04	80,2		64,07	14,51	40,38	1,46
06/12/2024	Farrobo	1	Arbequina	9	0,18	7	0,14	77,15		64,52	14,76	41,6	2,06
06/12/2024	Farrobo	2	Arbequina	16	0,32	7	0,14	72,02		62,43	15,67	41,71	3,32
11/10/2024	Sousa	1	Arbequina	3	0,06	1	0,02	85,58		57,10	15,99	37,27	0,20
11/10/2024	Sousa	2	Arbequina	5	0,10	2	0,04	89,23		57,58	16,36	38,57	0,28
08/11/2024	Sousa	1	Arbequina	15	0,30	4	0,08	93,29		62,3	15,81	41,94	2,2
08/11/2024	Sousa	2	Arbequina	16	0,32	5	0,10	100,06		63,09	15,41	41,75	2,07
06/12/2024	Sousa	1	Arbequina	26	0,52	22	0,44	69,92		51,98	20,10	41,86	16,5
06/12/2024	Sousa	2	Arbequina	36	0,72	11	0,22	61,3		49,27	21,34	42,07	19,94



INTERNATIONAL
OLIVE
COUNCIL

COI/T.20/Doc. No 34/Rev. 1
2017

ENGLISH
Original: ENGLISH

Príncipe de Vergara, 554 - 28002 Madrid - España Telef: +34 915 803 838 Fax: +34 915 831 263 - e-mail: icoi@internationalolivecouncil.org - <http://www.internationalolivecouncil.org/>

METHOD

DETERMINATION OF FREE FATTY ACIDS, COLD METHOD

1. SCOPE AND FIELD OF APPLICATION

This method describes the determination of free fatty acids in olive oils and olive pomace oils. The content of free fatty acids is expressed as acidity, calculated as the percentage of oleic acid.

2. PRINCIPLE

A sample is dissolved in a mixture of solvents and the free fatty acids present are titrated using a potassium hydroxide or sodium hydroxide solution.

3. REAGENTS

All the reagents should be of recognized analytical quality and the water used either distilled or of equivalent purity.

3.1. Diethyl ether; 95 % ethanol (v/v), mixture of equal parts by volume.

Neutralize precisely at the moment of use with the potassium hydroxide solution (3.2), with the addition of 0.3 ml of the phenolphthalein solution (3.3) per 100 ml of mixture.

Note 1: *Diethyl ether is highly inflammable and may form explosive peroxides. Special care should be taken in its use.*

Note 2: *If it is not possible to use diethyl ether, a mixture of solvents containing ethanol and toluene may be used. If necessary, ethanol may be replaced by propanol-2.*

3.2. Potassium hydroxide or sodium hydroxide, titrated ethanolic or aqueous solution, c(KOH) about 0.1 mol/l or, if necessary, c(KOH) about 0.5 mol/l. Commercial solutions are available.

The exact concentration of the potassium hydroxide solution (or sodium hydroxide solution) must be known and checked prior to use. Use a solution prepared at least five days before use and decanted into a brown glass bottle with a rubber stopper. The solution should be colourless or straw coloured.

If phase separation is observed when using aqueous solution of potassium hydroxide (or sodium hydroxide), replace the aqueous solution by an ethanolic solution.

Note 3: *A stable colourless solution of potassium hydroxide (or sodium hydroxide) may be prepared as follows. Bring to the boil 1 000 ml of ethanol or water with 8 g of potassium hydroxide (or sodium hydroxide) and 0.5 g of aluminium shavings and continue boiling under reflux for one hour. Distil immediately. Dissolve in the distillate the required quantity of potassium hydroxide (or sodium hydroxide). Leave for several days and decant the clear supernatant liquid from the precipitate of potassium carbonate (or sodium carbonate). The solution may also be prepared without distillation as follows: to 1 000 ml of ethanol (or water) add 4 ml of aluminium butylate and leave the mixture for several days. Decant the*

supernatant liquid and dissolve the required quantity of potassium hydroxide (or sodium hydroxide). The solution is ready for use.

- 3.3. Phenolphthalein, 10 g/l solution in 95 to 96 % ethanol (v/v), alkali blue 6B or thymolphthalein, 20 g/l solution in 95 to 96 % ethanol (v/v). In the case of strongly coloured oils, alkali blue or thymolphthalein shall be used.

4. APPARATUS

Usual laboratory equipment including:

- 4.1. Analytical balance;
- 4.2. 250 ml conical flask;
- 4.3. 10 ml burette class A, graduated in 0.05 ml, or equivalent automatic burette.

5. PROCEDURE

- 5.1. Preparation of the test sample

When the sample is cloudy, it should be filtered.

- 5.2. Test portion

Take a sample depending on the presumed acidity in accordance with the following table:

Expected acidity (oleic acidity g/100g)	Mass of sample (g)	Weighing accuracy (g)
0 to 2	10	0.02
> 2 to 7.5	2.5	0.01
> 7.5	0.5	0.001

Weigh the sample in the conical flask (4.2).

- 5.3. Determination

Dissolve the sample (5.2) in 50 to 100 ml of the previously neutralized mixture of diethyl ether and ethanol (3.1).

Titrate while stirring with the 0.1 mol/l solution of potassium hydroxide (3.2) (see Note 4) until the indicator changes (the colour of the coloured indicator persists for at least 10 seconds).

Note 4: *If the quantity of 0.1 mol/l potassium hydroxide solution required exceeds 10 ml, use the 0.5 mol/l solution or change the sample mass according to the expected free acidity and the proposed table.*

Note 5: *If the solution becomes cloudy during titration, add enough of the solvents (3.1) to give a clear solution.*

Carry out a second determination only if the first result is higher than the specified limit for the category of the oil.

6. EXPRESSION OF RESULTS

Acidity, as percentage of oleic acid by weight is equal to:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

where:

V = the volume of titrated potassium hydroxide solution used, in millilitres;

c = the exact concentration in moles per litre of the titrated solution of potassium hydroxide used;

M = 282 g/mol, the molar mass in grams per mole of oleic acid;

m = the mass of the sample, in grams.

Oleic acidity is reported as follows:

(a) to two decimal places for values from 0 up to and including 1;

(b) to one decimal place for values from 1 up to and including 100.

PRECISION VALUES OF THE METHOD

Analysis of the collaborative test results

More than 20 laboratories took part in the collaborative test arranged by the International Olive Council in 2014 and 2015.

The test was performed on 5 samples in 2014 and 3 samples in 2015:

PA 1-2014: crude olive pomace oil

PA 2-2014: refined olive pomace oil

PA 3-2014: refined olive oil

PA 4-2014: extra virgin olive oil (Mario Solinas prize) – 2011 crop

PA 5-2014: extra virgin olive oil (Mario Solinas prize) – 2014 crop

PA 6-2015: 70% lampante olive oil + 30% grape seed oil

PA 7-2015: late harvest extra virgin olive oil

PA 8-2015: 90% lampante olive oil + 10% palm olein

The results of the collaborative tests have been statistically processed according to the rules laid down in the international standards ISO 5725-2. Outliers were examined by applying Cochran's and Grubbs' test to the laboratory results for each determination (replicates *a* and *b*) and each sample.

The table lists:

n	number of participating laboratories
outliers	number of laboratories with outlying values
mean	mean of the accepted results (g/100g)
S_r	repeatability standard deviation (g/100g)
RDS_r (%)	relative standard deviation for repeatability (S _r x 100/mean)
r	value below which the absolute difference between two single independent test results obtained with the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within short intervals of time may be expected to lie with a probability of 95% (S _r multiplied by 2.8) (g/100g)
S_R	reproducibility standard deviation (g/100g)

RDS_R (%) relative standard deviation for reproducibility ($SR \times 100/\text{mean}$)
R value below which the absolute difference between two single test results obtained with the same method on identical test material in different laboratories with different operators using different equipment may be expected to lie with a probability of 95% (SR multiplied by 2.8) (g/100g)

	A	B	C	D	E	F	G	H
n	22	22	22	22	22	20	20	20
outliers	1	1	2	2	0	2	3	2
mean	6,3	0,11	0,07	0,13	0,15	1,4	0,50	0,69
r	0,144	0,019	0,018	0,011	0,021	0,015	0,018	0,022
S_r	0,052	0,007	0,006	0,004	0,007	0,005	0,006	0,008
RSD_r(%)	0,8	6,1	9,3	3,2	4,8	0,4	1,3	1,1
R	0,535	0,074	0,043	0,053	0,100	0,121	0,074	0,085
S_R	0,191	0,027	0,015	0,019	0,036	0,043	0,026	0,030
RSD_R(%)	3,0	24,2	22,7	14,7	23,3	3,1	5,3	4,4