

**Acompanhamento ao nível físico-químico e
microbiológico da fermentação de
azeitona Negrinha de Freixo de cura natural**

Maiyara da Conceição

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por
Professora Doutora Elsa Ramalhosa
Doutora Maria de Fátima Tomé Martins

**Bragança
2022**

Trabalho realizado no âmbito do Projeto “OleaChain: Competências para a sustentabilidade e inovação da cadeia de valor do olival tradicional no Norte Interior de Portugal” (NORTE-06-3559-FSE-000188). Este trabalho foi também parcialmente financiado pelo CIMO (UID/AGR/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2021) através do FEDER e PIDDAC.

À minha avó Leonor Daio

Aos meus tios e irmãos

Agradecimentos

Até aqui, mais uma vez me ajudou o Senhor. É com muita gratidão e muito prazer que eu agradeço a todos aqueles que fizeram parte desta etapa maravilhosa. Em particular, gostaria de expressar os meus agradecimentos a mim mesma e a todos aqueles que me acompanharam, orientaram e ajudaram ao longo do desenvolvimento deste estudo. A concretização deste trabalho não seria possível sem o apoio deles.

À minha orientadora, Professora Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa, que além uma professora incrível, tive a oportunidade de ser orientada por ela. Sempre esteve disponível para ajudar e sempre disposta a dar conselhos. Obrigada pela atenção, amizade, carinho, paciência e sugestões.

À minha co-orientadora, Doutora Maria de Fátima Tomé Martins, agradeço por me ter acompanhado em todos os ensaios, pela paciência e compreensão demonstradas durante este estudo, pela amizade, transmissão de conhecimentos, pela exigência, por todo o apoio disponibilizado no laboratório e pela ajuda incansável e por toda a dedicação que disponibilizou durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Anabela Rodrigues Lourenço Martins pelo incentivo, conselhos e o pelo encorajamento.

À minha família e ao meu namorado, um enorme obrigada, por acreditarem sempre em mim, e sempre me terem apoiado e ajudado. Agradeço pela oportunidade que me proporcionaram e por terem sempre confiado e nunca terem desistido de mim.

Aos colegas do Laboratório de Agroindústrias, que durante este tempo partilharam comigo o laboratório, amigos e colegas, e em especial o Filipe Lema, a Maria do Céu Fidalgo e a Ana Filipa Nascimento, pela amizade, ajuda e disposição.

Às funcionárias dos Serviços Centrais do Instituto Politécnico de Bragança, em especial à Ana Mota, Marina Martins e Olga Padrão, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus amigos e colegas, Estefânia Tavares, Adeluisina D`Alva, Helgeneusa Costa, Auryo Gomes, Marta Cuamba, Elcy Amado, Vilerjo Gomes, Kelly Vieira, Walkiria Chantre, Márcia Vera Cruz, Alice Frota, Neizy Mandinga e Vânia Costa.

A todos, um Muito Obrigada!

Resumo

As azeitonas de mesa estão entre os produtos alimentares fermentados mais populares em todo o mundo, e em especial na região do mediterrâneo. De entre os processos de produção para tornar as azeitonas edíveis, destaca-se a fermentação natural, conduzida apenas por microrganismos autóctones presentes na película da azeitona. Na região de Trás-os-Montes, a azeitona de mesa Negrinha de Freixo é produzida por fermentação natural em salmoura. Apesar de serem considerados frutos de excelência, poucos estudos existem relativos à evolução e ao comportamento da microflora presente no processo fermentativo de cura natural. Neste sentido, o presente trabalho pretendeu avaliar a evolução da população microbiana ao longo do processo de fermentação natural em salmoura (0, 3, 6, 9 e 12% de NaCl, m/v) e nos frutos da variedade Negrinha de Freixo, bem como proceder à identificação morfológica e molecular através de amplificação da região do DNA nuclear, das espécies encontradas. Foram também avaliados parâmetros físico-químicos na salmoura e nas azeitonas, designadamente textura, pH e acidez titulável. No final da fermentação avaliou-se a presença de agentes patogénicos, designadamente *Salmonella*, *Listeria*, Enterobacteriaceae e *Clostridium* sulfito redutores, designadamente o *Clostridium perfringens*. Verificou-se que as espécies mais abundantes nas salmouras e na polpa dos frutos foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida boidinii*, *Aerobasidium pullulans* e *Candida assseri*. Para as concentrações de sal mais elevadas (9% e 12%), as espécies *A. pullulans*, *Candida atlantica* e *Candida aaseri* foram mais favorecidas relativamente às espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Sporobolomyces roseus*. Relativamente às bactérias ácido lácticas (BAL), três espécies foram identificadas, designadamente, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. De entre os patogénicos analisados, os mesmos não foram detetados no final da fermentação. Relativamente aos parâmetros físico-químicos, observaram-se diferenças significativas entre os estados de maturação, tendo as azeitonas verdes apresentado os maiores valores de mediana para a dureza e mastigabilidade, e menores para a adesividade, elasticidade e coesividade. Observou-se um aumento do pH na salmoura ao longo da fermentação. O pH na polpa foi pouco influenciado pela concentração de sal e o estado de maturação dos frutos. Observou-se um aumento na acidez titulável nas salmouras com 6%, 9% e 12% de NaCl dos 30 aos 90 dias, sendo mais acentuado nas azeitonas verdes, tendo a acidez titulável

diminuído posteriormente até aos 210 dias. Comportamento semelhante foi obtido para o fruto. Estes resultados demonstram a importância dos produtores fazerem a monitorização e correção do pH, através da adição de suplementos de glucose e sacarose, substâncias reguladoras de acidez ou da inoculação com BAL e leveduras.

Palavras-chaves: Azeitonas de mesa; salmoura; cura natural; microrganismos; parâmetros físico-químicos.

Abstract

Table olives are among the most popular fermented food products worldwide, especially in the Mediterranean region. Natural fermentation stands out among the production processes to make table olives edible, conducted only by autochthonous microorganisms present in the olive skin. In the region of Trás-os-Montes, Negrinha de Freixo table olives are produced by natural fermentation in brine. Despite being considered fruits of excellence, few studies exist concerning the evolution and behaviour of the microflora present in the fermentation process of natural curing. In this sense, the present work aimed to evaluate the evolution of the microbial population during the process of natural fermentation in brine (0, 3, 6, 9 and 12% of NaCl, m/v) and in the fruits of the Negrinha de Freixo variety, as well as how to proceed with the morphological and molecular identification through amplification of the nuclear DNA region of the species found. Physicochemical parameters were also evaluated in the brine and the olives, namely texture, pH and titratable acidity. At the end of the fermentation, the presence of pathogens, namely *Salmonella*, *Listeria*, Enterobacteriaceae and *Clostridium* reducing sulphite, namely *Clostridium perfringens*, was evaluated. It was found that the most abundant species in the brines and fruit pulp were *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida boidinii*, *Aerobasidium pullulans* and *Candida assseri*. For the highest salt concentrations (9% and 12%), the species *A. pullulans*, *Candida atlantica* and *Candida aaseri* were more favoured over the species *Meyerozyma guilliermondii* and *Sporobolomyces roseus*. Regarding lactic acid bacteria (LAB), three species were identified: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Among the pathogens analyzed, they were not detected at the end of fermentation. Regarding the physicochemical parameters, significant differences were observed between the stages of maturation, with green olives showing the highest median values for hardness and chewiness, and the lowest for adhesiveness, springiness and cohesiveness. An increase in pH in the brine was observed throughout the fermentation. The pH in the pulp was little influenced by the concentration of salt and the state of maturation of the fruits. An increase in titratable acidity was observed in brines with 6%, 9% and 12% of NaCl from 30 to 90 days, being more pronounced in green olives, with the titratable acidity decreasing later until 210 days. Similar behaviour was obtained for the fruit. These results demonstrate the importance of producers monitoring and

correcting the pH by adding glucose and sucrose supplements, acidity-regulating substances or inoculation with LAB and yeasts.

Keywords: Table olives; brine; natural curing; microorganisms; physicochemical parameters.

Índice Geral

Resumo	iv
Abstract.....	vi
Índice Geral	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Lista de siglas, símbolos e abreviaturas.....	xiii
1. Enquadramento e Objetivos.....	2
2. Introdução.....	4
2.1 Azeitona de mesa	4
2.2. Variedades com aptidão para azeitona de mesa.....	7
2.2.1. Azeitona DOP – Azeitona de conserva Negrinha de Freixo	9
2.2 Tipos de tratamento de azeitona	12
2.2.1. Caso particular da cura natural	13
3. Parte Experimental	21
3.1. Recolha da matéria-prima e realização das fermentações	21
3.2. Avaliação de parâmetros físico-químicos	22
3.2.1. Determinação da textura.....	22
3.2.2. Determinação do pH na azeitona e na salmoura	22
3.2.3. Determinação da acidez titulável na azeitona e na salmoura	23
3.3. Avaliação de parâmetros microbiológicos.....	23
3.3.1. Preparação das amostras para análise.....	24
3.3.2. Contagem total dos microrganismos mesófilos aeróbios.....	24
3.3.3. Contagem de bolores e leveduras.....	25
3.3.4. Contagem de bactérias ácido láctico	25
3.3.5. Contagem de Enterobacteriaceae	25
3.3.6. Contagem de <i>Clostridium perfringens</i>	25
3.3.7. Pesquisa de <i>Listeria</i> spp e <i>Salmonella</i> spp.....	26
3.4. Caracterização morfológica e identificação molecular de populações microbianas	27
3.4.1. Identificação molecular dos isolados	27
3.4.2. Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose.....	28
3.4.3. Sequenciação e análise de sequências	28
3.5. Cálculos e tratamento estatístico.....	28

4. Resultados e Discussão.....	31
4.1. Parâmetros físico-químicos.....	31
4.1.1. Análise do perfil de textura das azeitonas verdes, mistas e pretas ao longo da fermentação.....	31
4.1.2. Evolução do pH da salmoura e da polpa do fruto ao longo da fermentação. 37	
4.1.3. Acidez titulável da salmoura e polpa do fruto ao longo da fermentação.....	41
4.2. Parâmetros microbiológicos.....	44
4.2.1. Contagem total de microrganismos na salmoura e na polpa do fruto durante a fermentação.....	44
4.2.2 Descrição dos isolados obtidos no final do processo fermentativo	50
4.2.3 Avaliação da presença de agentes patogénicos no final da fermentação	58
5. Conclusões.....	60
6. Referências Bibliográficas.....	63
ANEXOS.....	75

Índice de Figuras

Figura 1. Produção mundial de azeitona. Fonte: (FAOSTAT, 2021).....	5
Figura 2. Produção mundial de azeitona de mesa (mil toneladas) Fonte: (COI, 2021)....	6
Figura 3. Produção de azeitona de mesa em Portugal (Fonte: INE, 2022).....	6
Figura 4. Área geográfica da DOP Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo (adaptado do caderno de especificações) (Fonte: DGADR, 2022)	9
Figura 5. Pesagem das azeitonas para iniciar o processo de cura natural.....	21
Figura 6. Parâmetros da textura: (a) Dureza (g), (b) Adesividade (g.s), (c) Elasticidade, (d) Coesividade, (e) Mastigabilidade.....	32
Figura 7. Evolução da dureza (g), adesividade (g.s), elasticidade, coesividade e mastigabilidade da azeitona verde (a), mista (b) e preta (c) ao longo do tempo de fermentação.	33
Figura 7. (cont.) Evolução da dureza (g), adesividade (g.s), elasticidade, coesividade e mastigabilidade da azeitona verde (a), mista (b) e preta (c) ao longo do tempo de fermentação.	34
Figura 8. Gráficos Boxplot para os valores de pH determinados na azeitona (a) e na salmoura (b) em relação aos índices de maturação	38
Figura 9. Evolução do pH na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação; verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f), quando sujeitas a diferentes salmouras (0, 3, 6, 9 e 12% de NaCl) durante 210 dias de fermentação. Os valores representam a média da análise em triplicado \pm desvio padrão.....	39
Figura 10. Gráfico Boxplot para a acidez titulável determinada na azeitona (a) e na salmoura (b) em relação aos índices de maturação	42
Figura 11. Evolução da acidez titulável na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação; verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f), sujeitas a diferentes salmouras (0%, 3%, 6%, 9%, e 12% de NaCl) durante 210 dias de fermentação. Os valores representam a média da análise em triplicado \pm desvio padrão.....	43
Figura 12. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), (bactérias lácticas (\square), bolores (x) e leveduras (o) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 30 dias com diferentes concentrações de NaCl (%).	45
Figura 13. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), bactérias lácticas (\square), bolores (x) e leveduras (o) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 90 dias com diferentes concentrações de NaCl (%).	46
Figura 14. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), bactérias lácticas (\square), bolores (x) e leveduras (o) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas	

verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 210 dias com diferentes concentrações de NaCl (%). 47

Figura 15. Características macroscópicas de isolados de leveduras e bactérias ácido lácticas 51

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais variedades cultivadas em Portugal, características e aptidão (Leitão et al., 1986).....	8
Tabela 2. Principais características morfológicas da “Azeitona Negrinha de Freixo” (Ministério da Agricultura, s/d).	11
Tabela 3. Composição Nutricional da Azeitona Negrinha de Freixo.	12
Tabela 4. Descrição de trabalhos realizados a nível nacional e internacional de azeitona sujeita a cura natural	16
Tabela 5. Abundância de espécies de leveduras e LAB isoladas de cinco salmouras diferentes e de azeitonas de mesa Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação (verdes, mistas e pretas) no final do processo fermentativo.....	52

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

COI	Conselho Oleícola Internacional
DOP	Denominação de Origem Protegida
DGADR	Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
NaCl	Cloreto de sódio
p.s.	peso seco



1.Enquadramento e Objetivos

1. Enquadramento e Objetivos

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas com maior importância económica nos países Mediterrânicos, incluindo Portugal. O Nordeste Transmontano é reconhecidamente uma das mais importantes regiões produtoras no País. A azeitona de mesa proveniente da variedade Negrinha de Freixo, revela características únicas e a fermentação à qual é submetida, é considerada um dos métodos mais antigos de conservação de azeitonas.

Ao nível da produção podem ser aplicados diversos tratamentos. A cura natural é um deles, na qual não é aplicado qualquer tratamento de retirada do amargor, como por exemplo através da adição de hidróxido de sódio. Na maioria das situações, as fermentações decorrem de forma natural sem qualquer pré-tratamento, mantendo-se um processo empírico e variável. Alguns produtores referem problemas durante o processo fermentativo, desconhecendo as causas.

Assim sendo, no presente trabalho pretende-se fazer um acompanhamento ao nível físico-químico e microbiológico da fermentação de azeitonas de cura natural da variedade Negrinha de Freixo.

De forma a se obter mais conhecimento deste processo, na presente dissertação pretendeu-se:

1. Acompanhar a fermentação de azeitonas Negrinha de Freixo de cura natural, em diferentes estados de maturação, designadamente verdes, mistas e pretas ao longo do tempo.
2. Avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas nos frutos e na salmoura;
3. Avaliar a presença de agentes patogénicos, designadamente *Salmonella*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridium* sulfito redutores, designadamente o *Clostridium perfringens*, no final da fermentação.



2. Introdução

2. Introdução

2.1 Azeitona de mesa

A azeitona é o fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), espécie pertencente à família das oleáceas, cultivada para a produção de azeite e azeitona de mesa. A azeitona é considerada um produto importante, com grande tradição nos países mediterrânicos e tornou-se num dos alicerces da dieta mediterrânica pelos seus ingredientes nutricionais, químicos e outros (Rocha et al., 2020). De acordo com a Norma Portuguesa 3034 (2012), entende-se por "Azeitona de Mesa", o produto preparado a partir de frutos são de variedades cultivadas da oliveira (*Olea europaea* L.) que são escolhidas tendo em conta vários aspetos para a produção de azeitona: o volume, a forma, a relação polpa/caroço, características da polpa, a firmeza e facilidade de desprendimento do caroço, que as tornam adequadas para processamento de azeitonas de mesa (IPQ, 2012).

In natura, este fruto é considerado impróprio para consumo, por apresentar um componente responsável pelo seu sabor amargo, a oleuropeína, que é um glicosídeo presente naturalmente nas azeitonas (Arroyo-López et al., 2008). Tais características impedem que as azeitonas sejam consumidas diretamente da árvore e implica a realização de uma série de processos para torná-las um produto edível, muito apreciado. Estes processos diferem consideravelmente de região para região e têm vindo a sofrer alterações ao longo de gerações (Arroyo-López et al., 2008). As preparações baseiam-se essencialmente na forma como ocorre a eliminação do sabor amargo, e a forma de conservação. Entre as mais conhecidas temos a preparação de azeitonas de mesa por fermentação natural, e por preparação de estilo Sevilhano e estilo Californiano. As azeitonas podem ser preservadas por fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem adição de conservantes, podendo ser embaladas com ou sem líquido. Podem ser encontradas no mercado atual azeitonas com diferentes graus de maturação, forma e cor. Segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004) e o Codex Alimentarius (2013), existem três tipos de azeitonas de mesa, consoante o grau de maturação dos frutos. São assim consideradas:

Azeitonas verdes - frutos colhidos durante o período de amadurecimento (no início do Outono), apresentando a cor verde a amarelo-palha e que tenham atingido o tamanho normal.

Azeitonas mistas - frutos colhidos antes de atingirem a completa maturação (no Inverno), apresentando uma cor, entre os tons rosado a acastanhado.

Azeitonas pretas - frutos colhidos ao atingirem a maturação completa ou ligeiramente antes. A coloração do fruto pode variar entre o negro-avermelhado, a castanho-escuro, passando por tons violáceos.

Nos últimos tempos tem-se observado um ligeiro crescimento na produção de azeitona, com um total estimado de 23,6 milhões de toneladas (Figura 1) para a colheita de 2019/2020 (FAOSTAT, 2021). O ano de 2018 foi aquele onde se registou o maior valor, por volta dos 24,6 milhões de toneladas. Pelo contrário, o ano de 2014 foi aquele que apresentou a menor produção, com apenas 16,3 milhões de toneladas.

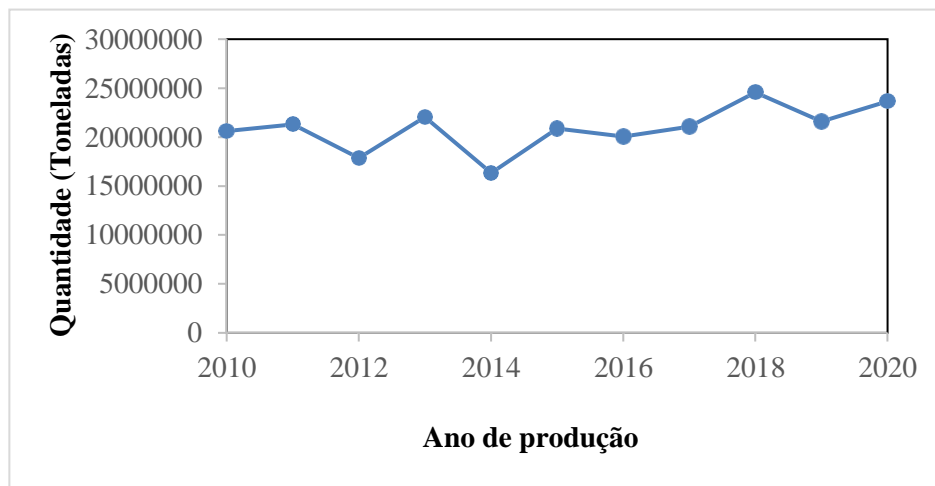


Figura 1. Produção mundial de azeitona. Fonte: (FAOSTAT, 2021).

Relativamente à produção mundial de azeitona de mesa, verificou-se que o ano de 2017 apresentou a maior produção, com cerca de 2069 mil toneladas, enquanto que o ano 2011, apresentou menor produção, com 1666 mil toneladas, como se pode observar na Figura 2 (COI, 2021).

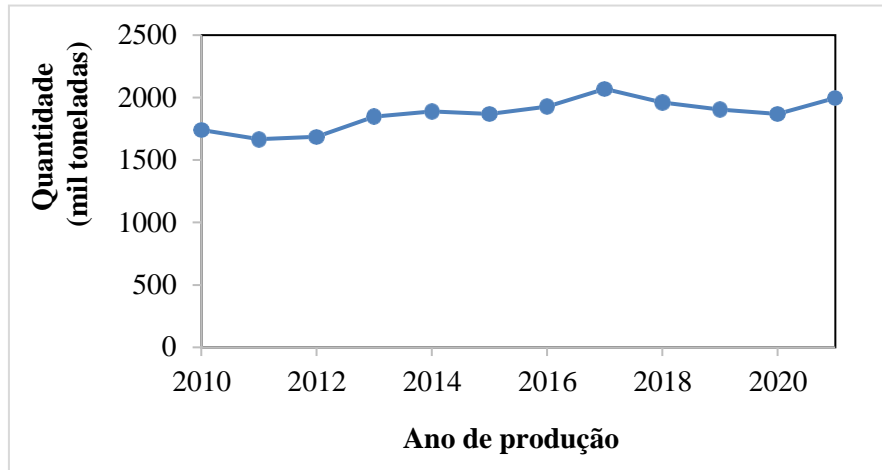


Figura 2. Produção mundial de azeitona de mesa (mil toneladas) Fonte: (COI, 2021).

Em Portugal, segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2022), no que diz respeito ao ano de 2020 (Figura 3), a região com maior produção de azeitona de mesa foi o Alentejo, com cerca de 53% da produção nacional, seguida da região Norte com 22%, Centro com 17%, Área Metropolitana de Lisboa com 6%, e Algarve com 2% (INE, 2022).

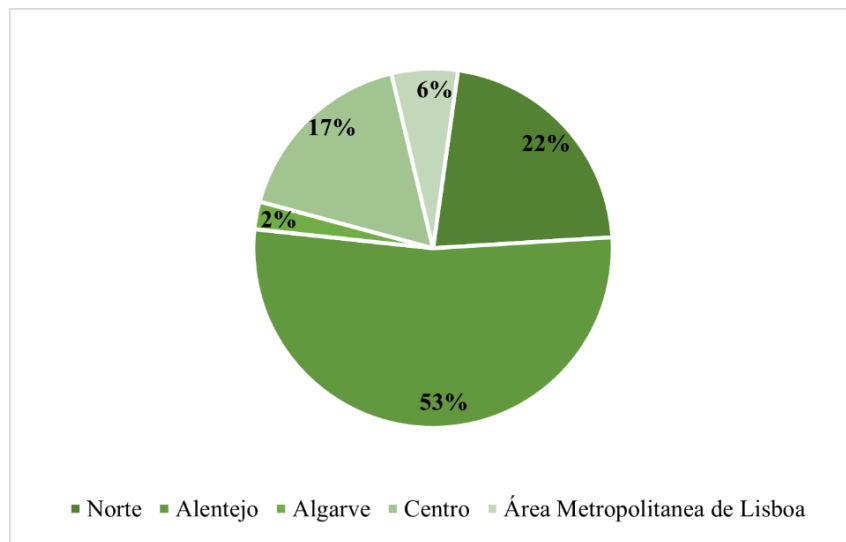


Figura 3. Produção de azeitona de mesa em Portugal (Fonte: INE, 2022).

2.2. Variedades com aptidão para azeitona de mesa

Entre as diversas variedades de oliveira nem todas produzem frutos com aptidão para o processamento de azeitonas de mesa. Umas são mais apropriadas para a produção de azeite, outras para a produção de azeitona de mesa e outras manifestam dupla aptidão (Leitão et al., 1986).

As variedades com aptidão para a produção de azeite, produzem frutos geralmente com maior teor em gordura, devido às suas características morfológicas e da polpa, e não são apropriadas para a produção de azeitona de mesa. São exemplo, a Madural e a Verdeal Transmontana. Por outro lado, as variedades com aptidão para azeitona de mesa, geralmente contêm um teor de gordura inferior, frutos regulares, boa relação polpa/caroço, polpa mais firme e fácil desprendimento do caroço. Devem ainda apresentar características desejáveis, tais como, sem depressões, podridão e picadas de insetos. Destacam-se as variedades Azeitoneira, Negrinha de Freixo, Maçanilha Algarvia e a Gordal (Antunes, 2019).

Das diversas variedades identificadas ao nível mundial, algumas por apresentarem determinadas características químicas e organolépticas, são muito apreciadas para certos tipos de preparação, não sendo recomendadas para outros (Ferreira, 2015). Em Portugal as variedades que mais são processadas são a Carrasquenha, Cobrançosa, Cordovil de Castelo Branco, Cordovil de Serpa, Galega Vulgar, Maçanilha Algarvia, Redondil e Negrinha (também conhecida como Negrinha do Freixo) (Leitão et al., 1986; Pires-Cabral et al., 2018).

Em Trás-os-Montes, a produção de azeitona de mesa tem uma grande tradição e incide essencialmente na variedade Negrinha de Freixo, embora outras variedades tenham vindo a ganhar expressão. O baixo rendimento em gordura (12 a 15%) e com elevada percentagem em polpa (83%), textura e consistência firme, tornam estes frutos com mais aptidão para a produção de azeitona de mesa do que propriamente para produção de azeite (Nogueira, 2012).

Como no presente trabalho se pretende abordar unicamente a azeitona de mesa, na Tabela 1 encontram-se descritas as principais características das variedades de azeitonas com dupla aptidão e com aptidão só para azeitona de mesa. De entre as 19 indicadas, seis delas são geralmente usadas apenas para a produção de azeitona de mesa, por apresentar pouco

rendimento em azeite, sendo as treze restantes utilizadas para a produção de azeite e também para a produção de azeitona de mesa.

Tabela 1. Principais variedades cultivadas em Portugal, características e aptidão (Leitão et al., 1986).

Variedades	Características	Aptidão
Azeitoneira ou azeiteira	Apropriada para conserva, tanto em verde como preta, caseira e industrial. Apresenta fraco rendimento em azeite.	Azeitona de Mesa
Bical de Castelo Branco	Fruto próprio para conserva. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Branquita ou Blanqueta	Fruto próprio para conserva em verde ou preto, caseira e industrial. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Carrasquenha	Fruto próprio para conservar em verde, caseira e industrial. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Cobrançosa	Está sendo cada vez mais utilizada em conserva. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Conserva de Elvas	Qualidades sápidas, azeitona de mesa (verde). Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Cordovil de Castelo Branco	Fruto próprio para conserva. Bom rendimento em azeite	Dupla Aptidão
Cordovil de Serpa	Fruto próprio para conserva em verde, caseira ou industrial. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Galega Grada de Serpa	Fruto próprio para conserva em preta, tipo artesanal. Fraco a médio rendimento em azeite.	Azeitona de Mesa
Galega Vulgar ou Galega	Apropriada para conserva em preta, tipo caseira e industrial. Apresenta fraco ou médio rendimento em azeite.	Azeitona de Mesa
Gordal	Própria para conserva em verde. Fraco rendimento em azeite.	Azeitona de Mesa
Hojiblanca	Utilizada para conserva em verde e principalmente em preta. Apresenta fraco rendimento em azeite.	Azeitona de Mesa
Maçanilha Algarvia	Fruto próprio para conserva em verde, e em meia maturação. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Maçanilha Carrasquenha de Almendralejo	Fruto próprio para conserva. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Maçanilha ou Maçanilha fina	Fruto próprio para conserva em verde, excelente qualidade. Médio rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Negrinha	Conserva verde ou preta, tipo industrial ou caseira. Fraco rendimento em azeite	Azeitona de Mesa
Redondal	Própria para conserva. Apresenta bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Redondil	Excelente para conserva em verde. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão
Verdeal Alentejana ou Verdeal de Serpa	Utilizada para conserva em verde, artesanal, britada. Bom rendimento em azeite.	Dupla Aptidão

2.2.1. Azeitona DOP – Azeitona de conserva Negrinha de Freixo

Até ao momento, em Portugal estão reconhecidos dois produtos com a Denominação de Origem Protegida para o processamento de azeitona de mesa, nomeadamente a “Azeitona de conserva Negrinha de Freixo”, com o número de registo PDO-PT-0231, e a “Azeitona de Conserva de Elvas e Campo Maior” (PDO-PT-9216). De referir que se encontra em análise o pedido de certificação IGP para a Azeitona Galega da Beira Baixa (PGI-PT-02508) (*eAmbrosia*, 2022).

A “Negrinha de Freixo” é o fruto da oliveira da variedade Negrinha, sendo mais vocacionada para a conserva do que propriamente para a produção de azeite (Ministério da Agricultura, s/d), tal como anteriormente indicado. As azeitonas utilizadas na produção da azeitona de conserva Negrinha de Freixo, podem encontrar-se em diferentes colorações, sendo negras tratadas ou azeitonas maduras, em salmoura, sofrendo diferentes tipos de preparação (Antunes, 2019). A sua área geográfica de produção está restrita aos concelhos de Vila Nova de Foz Côa, Freixo de Espada à Cinta, Torre de Moncorvo, Alfândega da Fé, Vila Flor, Mirandela e Macedo de Cavaleiros (Ministério da Agricultura, s/d) (Figura 4).

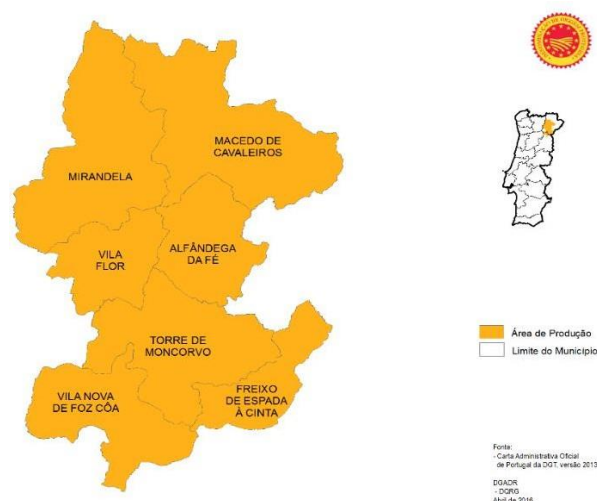


Figura 4. Área geográfica da DOP Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo (adaptado do caderno de especificações) (Fonte: DGADR, 2022)

É uma azeitona que, devido às boas condições climáticas, é produzida sem recurso ao uso de pesticidas. De acordo com a Norma Portuguesa 3034 (2012), a colheita dos frutos, deverá ser feita manualmente, seguindo-se a sua calibração. As azeitonas são classificadas

nas classes de 201 a 400 frutos/kg, de acordo com os critérios e tolerâncias (Ministério da Agricultura, s/d; Norma Portuguesa 3034, 2012).

Segundo o Caderno de Especificações (Ministério da Agricultura, s/d) e tendo em conta as normas de produção de azeitona de Conserva Negrinha de Freixo, na confeção deste tipo de azeitona de mesa deverão ser utilizados frutos inteiros, sãos, em estado de maturação adequado, com forma arredondada, lisa, terminando em ligeiro bico e consistência firme, livre de defeitos e de matérias estranhas. A cor do fruto deverá variar de verde-amarelada a negro violáceo, dependendo do tipo de maturação.

Consoante o tipo de tratamento que poderá ser aplicado à Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo poderão ser obtidos três tipos, nomeadamente:

Azeitonas do tipo verde, preparadas em salmoura, sendo os frutos colhidos de cor verde a verde-amarelada e tratados com solução diluída de hidróxido de sódio de 1,5 a 2,5%; após lavagem com água são colocados em salmoura de aproximadamente 10% de sal, processo onde decorre a fermentação láctica;

Azeitonas maduras em salmoura, produzidas a partir de frutos colhidos em plena maturação ou pouco antes, apresentando uma cor violácea uniforme, sendo realizada uma conservação por imersão em salmoura, com uma concentração de sal entre 8 a 10% onde ocorre a fermentação, durante 6 a 9 meses, até perderem o sabor amargo. O enegrecimento ocorre por simples exposição ao ar durante a escolha e classificação dos frutos;

Azeitonas negras tratadas, obtidas a partir de frutos não totalmente maduros, colhidos na mudança da cor verde para negro violáceo e enegrecidos por oxidação. O amargo é eliminado por um ou mais tratamentos com hidróxido de sódio.(Ministério da Agricultura, s/d).

Contudo, deve ser referido que do nosso conhecimento, não é comum os produtores da região de Trás-os-Montes efetuarem tratamentos com hidróxido de sódio ou efetuarem oxidação dos frutos.

Após decorrido o processo de fermentação, as azeitonas devem ser colocadas numa nova salmoura preparada com quantidades de sal específicas, para uma melhor conservação. O acondicionamento deverá ser em material apropriado como o vidro, lata ou qualquer material inócuo, não reativo que preserve a qualidade nutricional do alimento e evite o

crescimento de microrganismos indesejados. De acordo com o caderno de especificações, o peso máximo das embalagens não deverá ultrapassar os 15 kg de peso escorrido. A apresentação da embalagem e respetiva rotulagem deverá seguir os termos da legislação em vigor.

Na Tabela 2 encontram-se descritas as principais características morfológicas da “Azeitona Negrinha de Freixo” (Ministério da Agricultura, s/d).

Tabela 2. Principais características morfológicas da “Azeitona Negrinha de Freixo” (Ministério da Agricultura, s/d).

Características Morfológicas da Azeitona Negrinha de Freixo

Calibre: 201 a 400 frutos/kg

Peso: 3 a 5 gramas

A azeitona madura é de cor preta intensa.

Volume: 3 a 5 cm³

Rendimento em gordura: 12 a 15%

Percentagem de polpa: aprox. 83%

Forma esférica terminando num ligeiro bico.

Cor verde-amarelada a negro violáceo

Além das características morfológicas, a perceção dos consumidores sobre a qualidade da azeitona no seu consumo, está a melhorar e hoje em dia pode ser observada uma procura crescente de produtos mais saudáveis em todo mundo. Na Tabela 3 encontram-se descritos os valores relativos à composição nutricional da azeitona Negrinha de Freixo, determinados em estudos realizados a essa variedade.

Tabela 3. Composição Nutricional da Azeitona Negrinha de Freixo.

Composição da Azeitona Negrinha de Freixo						
Humidade (%, p.f.)	Cinzas (%, p.s.)	Gordura (%, p.s.)	Proteínas (%, p.s.)	Hidratos de Carbono (%, p.s.)	Valor Energético (kcal/100 g p.s.)	Referência
73,4 ± 0,2	24,2 ± 2,5	38,3 ± 5,0	16,5 ± 0,1	20,7 ± 3,9	496 ± 31	Nogueira (2012)
76,7 ± 0,4	2,0 ± 0,2	60,5 ± 2,0	22,7 ± 0,6	14,6 ± 3,1	695 ± 17	
70,1 ± 0,2	23,7 ± 0,3	47,2 ± 4,1	12,7 ± 0,1	16,4 ± 4,1	542 ± 21	
75,7 ± 3,7	7,0 ± 1,5	53,5 ± 12,2	3,7 ± 0,0	35,8 ± 16,6	638 ± 175	Malheiro et al. (2012)
62,7 ± 1,2	-	52,1 ± 0,5	-	-	-	Sousa (2015)
74,5 ± 2,8	12,2 ± 0,2	69,1 ± 11,1	-	-	-	Antunes (2019)

Quanto à composição da Negrinha de Freixo, observou-se que o teor da humidade variou entre 62,7 e 76,7%, as cinzas entre 2,0 e 24,2%, a gordura entre 38,3 e 69,1%, proteína de 3,7 a 22,7%, hidratos de carbono de 14,6 a 35,8% e valores energéticos de 496 e 695 kcal/100 g p.s.. As maiores gamas de valores foram observadas ao nível das cinzas e da gordura, uma vez que em alguns trabalhos foram analisadas azeitonas obtidas de produtores em que os frutos já se encontravam em salmoura, da qual se desconhece o teor em sal, mas que justifica os maiores valores de cinzas determinados nos frutos. A presença de sal, traduzida numa percentagem de cinzas maiores, faz com que os restantes componentes diminuam quando expressos em matéria seca.

2.2 Tipos de tratamento de azeitona

As azeitonas colhidas diretamente da árvore apresentam textura mais consistente e um gosto particularmente amargo, não sendo possível o seu consumo. Os frutos no estado natural estão repletos de oleuropeína, um composto fenólico que lhe confere o sabor amargo (Fadda et al., 2014). As azeitonas só se tornam verdadeiramente edíveis após a cura, devendo para tal ser sujeitas a diferentes processos de preparação. O recurso ao sal e soda cáustica são alguns dos tratamentos aplicados, com o principal objetivo de atingirem um nível aceitável de amargor, para melhorar as características sensoriais e para

garantir a segurança do consumo (Gómez et al., 2006). À medida que as azeitonas estão imersas na salmoura, a oleuropeína difunde-se e dissolve-se na água, ocorrendo aremoção parcial do amargor. A azeitona torna-se assim, um produto alimentar altamente valorizado e muito apreciado pelos consumidores. O processo de cura envolve também uma fermentação, onde fontes de hidratos de carbono (ex. açúcares naturais) presentes nas azeitonas se transformam em ácido láctico, enquanto os compostos fenólicos e outras substâncias são libertados para o meio (Di Cagno et al., 2013).

Entre os vários processos de preparação, os que apresentam maior relevância ao nível mundial são: Sevilhano ou Espanhol (azeitona verde em salmoura), Californiano (azeitona preta oxidada) e o Grego ou fermentação natural (azeitona natural) (Campus et al., 2018). Nos processos Sevilhano e Californiano, o amargor do fruto proveniente dos compostos fenólicos é removido por tratamento com solução de hidróxido de sódio (NaOH). De acordo com a região, verifica-se que diferentes métodos de produção de azeitona de mesa podem ser aplicados. São considerados fatores essenciais a variedade da oliveira, condições climáticas e todo o conhecimento empírico adquirido ao longo de várias gerações. Na região de Trás-os-Montes, a produção da azeitona de mesa tem uma grande tradição, sendo este alimento considerado parte integrante da gastronomia local. A fermentação natural (cura natural) é o processo mais comum e mais aplicado às azeitonas de mesa (Borges, 2013).

2.2.1. Caso particular da cura natural

A cura natural de azeitonas de mesa, é um processo tradicional que tem sido aperfeiçoado ao longo de várias gerações. Consiste na remoção lenta e incompleta de compostos fenólicos sem que ocorram alterações físico-químicas muito significativas nas azeitonas (Gandul-Rojas & Gallardo-Guerrero, 2020).

Os frutos devem ser colhidos manualmente ou por ripagem, isentos de feridas ou pragas, em particular a mosca da azeitona, em que as larvas se encontram no interior do fruto. Seguidamente, as azeitonas são lavadas em água corrente e colocadas diretamente em salmoura com uma concentração de sal que pode variar entre 6 e 10%. De acordo com as condições climáticas da região de produção, a concentração de sal adicionada à salmoura poderá ser inferior (Bleve et al., 2014).

O processo fermentativo ocorre espontaneamente e de forma muito lenta durante vários meses. Nesse período a água da salmoura é trocada regularmente e a oleuropeína é solubilizada promovendo a redução parcial do amargor das azeitonas (Randazzo et al., 2004). As azeitonas de mesa representam um habitat complexo onde bactérias Gram-negativas, bactérias lácticas e leveduras co-interagem e se desenvolvem ao longo de todo o processo. Como resultado, as azeitonas adquirem as qualidades organolépticas proporcionadas pelo ambiente local que inclui a presença da microbiota que cresce durante a fermentação (Gómez et al., 2006). Além disso, as condições que prevalecem neste habitat determinam a atividade metabólica, o crescimento e a sobrevivência da população microbiana (Hurtado et al., 2008). Estudos microbiológicos revelaram que as principais espécies de leveduras presentes neste nicho ecológico pertencem aos géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Candida* (Arroyo-López et al., 2008; Pereira et al., 2015). As leveduras podem desempenhar um papel duplo durante a fermentação da azeitona, estando associadas à produção de compostos voláteis (por exemplo, álcoois, acetato de etilo, acetaldeído) e metabolitos que melhoram o sabor, o aroma e as características de conservação do produto fermentado. Além disso, podem melhorar o crescimento de bactérias lácticas através da libertação de compostos nutritivos (Alves et al., 2012; Arroyo-López et al., 2008). Por outro lado, as leveduras podem provocar a formação de bolsas de gás, amolecimento dos tecidos da azeitona, turvação das salmouras e produção de sabores e odores desagradáveis (Arroyo-López et al., 2008).

Em relação às bactérias lácticas, estas são responsáveis pela remoção do amargor das azeitonas, promovem a diminuição do pH e inibem o crescimento de microrganismos patogénicos. Adicionalmente, conferem o correto perfil de sabor e textura ao produto final. As espécies que predominam ao longo do processo fermentativo são *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus paraplantarum* (Corsetti et al., 2012).

O conhecimento sobre a composição, a dinâmica e as potenciais interações que ocorrem na comunidade microbiana durante o processo de fermentação natural é crucial para garantir a produção de alimentos seguros e de alta qualidade. De facto, a diversidade da microbiota depende marcadamente dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos da matriz vegetal. Apesar do valor confiável da fermentação espontânea para estabilizar e conservar vegetais e frutas crus, vários fatores são a favor do uso de culturas starters selecionadas (Paba et al., 2020).

Até ao momento, a produção de azeitona de mesa Negrinha de Freixo DOP tem sido conduzida de forma empírica, sem conhecimento da microbiota e das propriedades químicas que ocorrem ao longo do processo de fermentação. Na Tabela 4 encontram-se descritos trabalhos realizados a nível nacional e internacional de azeitona sujeita a cura natural, sendo indicadas as variedades, as condições de fermentação aplicadas, os parâmetros avaliados e os microrganismos identificados, quando aplicável. Verificou-se que diversas variedades têm sido sujeitas à cura natural, como Carolea, Cobrançosa, Conservolea, Galega, Leucocarpa, Maçanilha, Negrinha de Freixo, Nyons e Sevilhana, com diferentes graus de maturação, tendo as fermentações sido estudadas entre 1 a 18 meses. As fermentações têm decorrido em salmoura, com uma concentração de sal entre 4 a 12% NaCl, sendo 8% a mais comum. Diversos microrganismos foram já identificados, destacando-se o *Aureobasidium pullulans*, *Candida aaseri*, *C. boidinii*, *C. famata*, *C. fermentati*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *C. membranaefaciens*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus albidus*, *C. carnescens*, *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces reessii*, *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pichia guilliermondii*, *P. kluyveri*, *P. manshurica*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces odoratus* e *Torulaspota delbruecki*.

Durante a fermentação há alterações ao nível da comunidade microbiana, podendo ser detetadas diferentes fases. Penland et al. (2020) ao estudar a fermentação da variedade Francesa Nyons durante 1,5 anos verificou que nos primeiros 7 dias, observaram uma diminuição na contagem de fungos filamentosos e bactérias. Entre os 21 e os 120 dias, o *W. anomalus* e *C. nyonsensis* para os fungos e a *Celerinatantimonas diazotrophica* (bactéria) dominaram a fermentação e estavam relacionados com a diminuição do pH e produção de ácido cítrico. Entre os 120 e 183 dias, aumentaram os ácidos e ésteres, bem como a abundância do *Z. mrakii*, *P. membranifaciens* e *C. boidinii*. Nos últimos meses da fermentação, a *P. membranifaciens* e a *C. boidinii* passaram a ser as dominantes. Ambas as espécies mostraram estar fortemente correlacionadas com o aumento de ésteresfrutados e álcoois.

Lanza et al. (2020), após 8 meses de fermentação, também só detetaram leveduras, tendo o género *Candida* sido o predominante, seguido do *Cryptococcus*.

Tabela 4. Descrição de trabalhos realizados a nível nacional e internacional de azeitona sujeita a cura natural

País	Variedade	Grau de maturação da azeitona (verde, mista e preta)	Condições de fermentação (Temperatura, tempo, % de sal)	Parâmetros avaliados (F/Q e Microbiológicos)	Microrganismos identificados	Referência
França	Nyons	Preta	- Temperatura ambiente (< 18 °C) - 1,5 anos - 10% NaCl	- pH - Compostos fenólicos - Ácidos orgânicos - Compostos voláteis - Fungos totais - Fungos halotolerantes - Contagem total a 30 °C - População total halotolerante - Enterobactérias - Bactérias ácido lácticas - Bactérias ácido lácticas halotolerantes - <i>Escherichia coli</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Salmonella</i> spp. - Identificação de microrganismos	- <i>Citeromyces nyonsensis</i> - <i>Wickerhamomyces anomalus</i> - <i>Zygorhizoglyphus mrakii</i> - <i>Candida boidinii</i> - <i>Pichia membranifaciens</i> - <i>Celerinatantimonas</i> genus	Penland et al. (2020)
Grécia Central	Conservolea	Preta	- Temperatura de 20°C - 6% NaCl - 35 dias	NA	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida aaseri</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nisiotou et al. (2010)

Cont. Tabela 4

Itália	Carolea e Leucocarpa	Preto-púrpura Branco-marfim	- Temperatura ambiente - 8% de NaCl - 8 meses	- Cor - Avaliação sensorial - Composição mineral - Monitoramento Microbiológico	<i>Candida krusei</i> <i>C. famata</i> <i>C. boidinii</i> <i>C. intermedia</i> <i>Cryptococcus albidus</i>	Lanza et al. (2020)
Perú	Sevilhana	Mistas	- Temperatura entre os 9 e os 24°C - 3 meses - 4-6-12% de NaCl	- Acidez - pH - Açúcares redutores	<i>Lactobacillus pentosus</i> Enterobacteriaceae <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida culliculosa</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Cryptococcus humicola</i> <i>Cryptococcus laurenti</i> <i>Geotrichum klebani</i>	Koc et al. (2013)
Portugal	Negrinha de Freixo	Verde	- Temperatura ambiente - 5 meses - 4,5-6% NaCl	- Acidez - pH - Leveduras	<i>Candida boidinii</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Galactomyces reessii</i> <i>Pichia manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pereira et al. (2015)
Portugal	Cobrançosa	Verdes e Pretas	- Temperatura ambiente (18,8°C) - 7 meses - 4-8% NaCl	- Acidez - pH - Cor - Textura - Atividade da água - Açúcares redutores - Cloreto de sódio - Salinidade - Compostos fenólicos	NI	Prata (2015)

Cont. Tabela 4

Portugal	Maçanilha (Britada)	Verde	-Temperatura ambiente (18°C e 25°C) - 1 mês - 8% de NaCl	- Cor - Acidez - pH - Açúcares redutores - Compostos fenólicos	<i>Cryptococcus</i> sp. <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Candida fermentati</i> <i>Candida membranaefaciens</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Sporobolomyces odoratus</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia guilliermondii</i>	Rodrigues (2011)
Portugal	Galega	Preta	-Temperatura ambiente - 8% NaCl - 7 e 8 meses	- Análise química - Fenóis - Compostos voláteis - Avaliação sensorial	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Torulaspota delbruecki</i> <i>Candida boidinii</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Oliveira et al. (2004)

NI – Não identificado.

NA – Não analisados.

No início da fermentação da Conservolea (Nisiotou et al., 2010), leveduras como *Metschnikowia pulcherrima* foram as dominantes, seguida pela *Debaryomyces hansenii* e a *Aureobasidium pullulans*. À medida que a fermentação foi decorrendo, passaram a predominar espécies do género *Pichia* (Nisiotou et al., 2010).

Pereira et al. (2015) ao estudarem a fermentação natural de Negrinha de Freixo, verificaram uma maior diversidade nas espécies isoladas entre os 44 e 54 dias de fermentação, tanto na salmoura como na polpa. Contudo, no final do processo, após 149 dias, a diversidade diminuiu. As espécies *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* foram as predominantes tanto na polpa como na salmoura.

Alguns autores referem que a diminuição do sal, favorece o desenvolvimento de bactérias lácticas (Koc et al., 2013). Além disso, há fatores como a adição de glucose ou ácido láctico (Nisiotou et al., 2010) que podem alterar a sucessão e dominância das leveduras ao longo da fermentação. Adicionalmente, o arejamento pode favorecer o desenvolvimento de Enterobacteriaceae (aspecto negativo), como de leveduras aeróbias, como por exemplo, *Geotrichum klebani*, *Candida culliculosa*, *Candida boidinii*, *Candida lipolytica* e *Cryptococcus humicola* (Koc et al., 2013).

Em termos gerais, pôde-se observar que o processo fermentativo associado a azeitonas de cura natural é bastante dinâmico e complexo. De facto, o processo fermentativo depende de fatores ambientais e da própria variedade utilizada na produção da azeitona de mesa, com a sua microbiota autóctone. Dessa forma é de extrema importância realizar estudos que permitam compreender os processos fermentativos da azeitona de mesa de modo a se obter um produto de qualidade e seguro.



3. Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1. Recolha da matéria-prima e realização das fermentações

As azeitonas da variedade Negrinha de Freixo utilizadas no presente estudo foram amavelmente fornecidas por um produtor da localidade de Mogadouro, da região de Trás-os-Montes, em novembro de 2021. Os frutos foram colhidos manualmente e transportados para o laboratório de Agro-Indústrias da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Seguidamente, procedeu-se à lavagem em água corrente e seleção das azeitonas por calibre e índices de maturação, designadamente em verdes, mistas e pretas. Foram selecionados os frutos isentos de feridas ou pragas, e as fermentações foram preparadas à escala laboratorial.

Na preparação da salmoura utilizou-se água e sal a diferentes concentrações: 0%, 3%, 6%, 9% e 12% de NaCl (m/v), sendo realizados ensaios em triplicado. Pesaram-se 300 g de azeitona e colocaram-se diretamente em frascos de vidro, aos quais foram adicionados 300 mL de salmoura (Figura 5). O processo fermentativo ocorreu espontaneamente entre novembro de 2021 e maio de 2022, à temperatura média de 18 °C e em condições parcialmente anaeróbias.

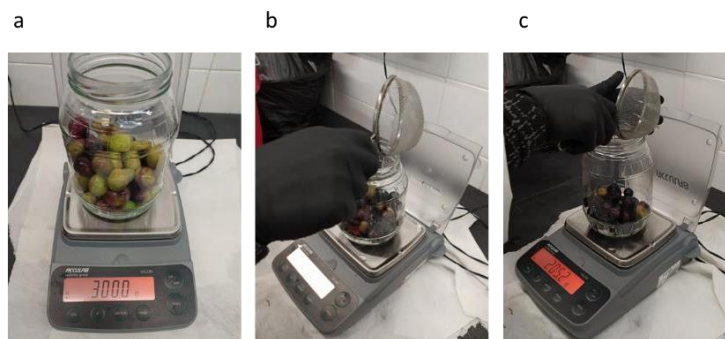


Figura 5. Pesagem das azeitonas para iniciar o processo de cura natural.

O acompanhamento do processo fermentativo foi realizado através da recolha de amostras de salmoura e de azeitona, de forma asséptica, em diferentes tempos de fermentação, designadamente aos 30, 90 e 210 dias, após a adição da salmoura. A avaliação dos diferentes parâmetros iniciou-se a partir dos 30 dias de fermentação, tempo considerado de equilíbrio entre a salmoura e as azeitonas, e o tempo necessário para o arranque do processo fermentativo.

Nas amostras recolhidas foram determinados parâmetros físico-químicos (textura, pH e acidez titulável) e microbiológicos (contagem total de bolores, leveduras, mesófilos totais

e bactérias lácticas). Adicionalmente foi realizada a caracterização morfológica e identificação molecular de leveduras e bactérias lácticas. No final da fermentação foi ainda avaliada a presença de Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp.

3.2. Avaliação de parâmetros físico-químicos

3.2.1. Determinação da textura

A textura foi avaliada em azeitonas frescas através de um teste de compressão, utilizando um texturómetro (TA. XT Plus Texture Analyser), equipado com uma célula de carga de 30 kg. Cada azeitona foi recolhida diretamente do frasco, colocada na horizontal e centrada debaixo da sonda antes da medição. A compressão das azeitonas foi realizada por meio de uma sonda cilíndrica plana (P/36R, diâmetro 36 mm), a uma velocidade de 5 mm/s e uma extensão de penetração de 7 mm.

Ao longo do processo fermentativo realizaram-se recolhas de amostras, e para cada intervalo de tempo definido, recolheram-se 10 frutos de cada frasco e realizaram-se 10 leituras. Todas as análises foram feitas à temperatura ambiente, sendo a aquisição e a integração de dados obtida através do software *Texture Exponent* TPA32 e aplicando-se o teste de Análise do Perfil de Textura (TPA), no qual são realizados dois ciclos de compressão. Desse modo, foram quantificados múltiplos parâmetros texturais, tais como a: dureza (força máxima obtida durante a primeira compressão), adesividade (trabalho negativo entre os dois ciclos), elasticidade (razão das distâncias relativas aos picos máximos determinados na segunda compressão e primeira compressão (Distância 2/Distância 1)), coesividade (razão das áreas relativas à segunda compressão e primeira compressão (Área 2/Área 1)) e mastigabilidade (Dureza × Coesividade × Elasticidade).

3.2.2. Determinação do pH na azeitona e na salmoura

O pH das amostras foi determinado por medição direta à temperatura ambiente utilizando um potenciómetro (*Hanna* HI-8417). O aparelho foi calibrado antes de se iniciarem as medições com as respetivas soluções tampão ($4,00 \pm 0,02$ e $7,00 \pm 0,02$ a 20 °C). Para a salmoura foi usado um volume de 20 mL de solução e o eletrodo de pH e sonda de temperatura foram introduzidos diretamente na amostra. Para a azeitona, foi preparada

previamente uma solução aquosa a partir de 5 g de polpa previamente triturada em 20 mL de água fervida e arrefecida. As leituras foram sempre realizadas em triplicado.

3.2.3. Determinação da acidez titulável na azeitona e na salmoura

A determinação da acidez titulável em azeitona fresca foi realizada através de uma titulação potenciométrica, seguindo a Norma Portuguesa NP 1421 (1997). Pesaram-se 5 g de azeitona moída para um balão de fundo redondo, no qual, foram adicionados 50 mL de água destilada previamente fervida e arrefecida à temperatura ambiente. Seguidamente adaptou-se um condensador de refluxo e aqueceu-se o preparado numa manta de aquecimento durante 30 minutos. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, transferiu-se a solução para uma proveta de 100 mL e completou-se o volume com água destilada fervida. Após homogeneização, filtrou-se a solução através de uma gaze (duas camadas) para um copo até se obter um volume de 30 mL. Mediram-se 25 mL do filtrado e procedeu-se a uma titulação com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M (padronizada previamente) até se atingir o pH de 8,1, utilizando-se para o efeito um medidor de pH (*Hanna* HI-8417). Quando necessário, calculou-se por interpolação, o valor exato do volume de solução de NaOH necessário para se obter um pH de 8,1. A acidez titulável da azeitona foi expressa em gramas de ácido láctico por 100 g de azeitona.

Relativamente à salmoura, a determinação da acidez titulável foi realizada aplicando a mesma metodologia descrita acima, titulando-se diretamente 20 mL de solução de salmoura. A acidez foi expressa em gramas de ácido láctico por 100 mL de salmoura. Foram sempre efetuados triplicados de cada amostra.

3.3. Avaliação de parâmetros microbiológicos

No sentido de conhecer a dinâmica microbiana ao longo do processo fermentativo, foram determinados parâmetros microbiológicos na salmoura e na película dos frutos. Para isso, procedeu-se à contagem total de microrganismos a 30 °C (mesófilos aeróbios), bolores, leveduras e bactérias lácticas. Realizou-se a caracterização morfológica e identificação molecular de leveduras e bactérias lácticas obtidas.

No final da fermentação, avaliaram-se as condições de qualidade e segurança microbiológica das azeitonas de mesa, através da deteção/pesquisa de microrganismos

patogénicos, designadamente Enterobacteriaceae, *Clostridium perfringens*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp.

3.3.1. Preparação das amostras para análise

As amostras de salmoura e de frutos foram sempre processadas em condições de assepsia, numa câmara de segurança biológica. Para cada intervalo de tempo avaliado, recolheram-se um total de 15 amostras de salmoura e 15 amostras de azeitona de mesa, relativas às cinco concentrações de sal, analisadas em triplicado. De cada frasco retiraram-se 25 mL de solução de salmoura e pesaram-se 25 g de frutos. Os frutos foram colocados em sacos *Stomacher*, contendo 225 mL de água peptonada 0,015% (m/v), seguindo-se a homogeneização e incubação a 25 °C durante 10 minutos com agitação ligeira. Seguidamente, efetuaram-se diluições decimais sucessivas em 9 mL da mesma solução de acordo com a norma ISO 6887-6:2013. Por fim, procedeu-se à inoculação das amostras em meios de cultura específicos para os respetivos microrganismos a quantificar.

A análise das amostras foi feita em triplicado e os resultados expressos em log UFC (unidades formadoras de colónias) por mL ou g, dependendo do tipo de amostra. A equação utilizada na quantificação de colónias foi a seguinte:

$$N = \frac{\sum C}{V.(n_1 + 0,1 \times n_2)d}$$

Sendo que:

N - número de unidades formadoras de colónias (UFC); $\sum C$ - soma das colónias contadas em duas placas contendo duas diluições sucessivas da amostra; n_1 - número de placas selecionadas da primeira diluição; n_2 - número de placas selecionadas da segunda diluição; d - diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens; V - volume inoculado (mL).

3.3.2. Contagem total dos microrganismos mesófilos aeróbios

A contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios foi realizada de acordo com a norma ISO 4833-1:2013, recorrendo ao meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA, *Himedia*). A sementeira realizou-se por inoculação de 0,1 mL de suspensão de cada diluição e espalhamento das amostras com espalhador estéril à superfície do meio de

cultura. Após a incubação das placas a 30 °C durante 48 horas, procedeu-se à contagem das colónias.

3.3.3. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada de acordo com a norma ISO 21527-1:2008, recorrendo à técnica da contagem em placa. Os meios de cultura usados foram *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, *Liofilchem*) e *Malt Extract Agar* (MEA, *Liofilchem*), com adição de 0,1% (m/v) de cloranfenicol. A sementeira realizou-se por inoculação de 0,1 mL de cada diluição decimal e espalhamento sobre o meio. A leitura efetuou-se após a incubação das placas a 25 °C durante 3 dias.

3.3.4. Contagem de bactérias ácido láctico

A contagem de bactérias ácido láctico efetuou-se segundo a norma BS ISO 15214:1998. A sementeira foi realizada por incorporação de 1 mL de cada diluição com o meio de cultura *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS, *Himedia*) suplementado com cicloheximida 0,01% (m/v), a pH 5,7. A amostra foi incorporada através de movimentos rotativos no meio de cultura, e após a solidificação verteu-se uma segunda camada de meio. A leitura e contagem das colónias realizou-se após incubação das placas a 30 °C durante 72 horas.

3.3.5. Contagem de Enterobacteriaceae

A contagem total de Enterobacteriaceae foi realizada de acordo com a norma ISO 21528-2:2004, tendo sido utilizadas placas *Compact Dry* ETB (*R-Biopharm*), que consistem em placas com substrato cromogénico e indicadores redox. O meio de cultura contém glucose e agentes seletivos para diferenciação e enumeração microbiana. As colónias específicas são detetadas pela coloração vermelha a violeta.

Aplicou-se 1 mL de cada amostra no centro da placa e procedeu-se à incubação a 37 °C durante 24 horas, efetuando-se a contagem total das colónias.

3.3.6. Contagem de *Clostridium perfringens*

No isolamento seletivo e enumeração de *Clostridium perfringens* seguiram-se as recomendações da norma ISO 7937:2004. Preparou-se o meio de cultura *Tryptone-Sulfite*

Cycloserine Agar (TSC, *BioKar*), suplementado com uma emulsão de gema de ovo, ao qual foi adicionado o antibiótico D-cicloserina 0,02% (m/v). Inoculou-se 1 mL de cada diluição, e espalhou-se por incorporação no meio de cultura. Após a solidificação aplicou-se uma segunda camada de meio. As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante 48 horas.

O *Clostridium perfringens* é um *Clostridium* sulfito redutor sendo capaz de reduzir o sulfito de sódio a sulfeto, formando com o citrato férrico, um precipitado preto de sulfeto de ferro. Este composto vai aparecer ao redor das colónias. Assim, o crescimento de colónias de coloração negra foi considerado um resultado positivo.

3.3.7. Pesquisa de *Listeria spp* e *Salmonella spp*

A pesquisa e enumeração de *Listeria spp.* foi realizada seguindo o procedimento definido pela ISO 11290-1:2017, tendo sido usado o teste *VIP Gold Listeria*, que consiste num imunoensaio visual de uma só etapa para a deteção de *Listeria* em amostras alimentares.

Pesaram-se 25 g de azeitona e colocaram-se num saco *Stomacher* com 225 mL de solução *Demi-Fraser*. Seguidamente, procedeu-se à homogeneização e incubação a 30 °C, durante 48 horas (processo de enriquecimento da amostra). Após esta fase, retirou-se 1 mL da solução e incubou-se a 100 °C por 5 minutos (processo de inativação da amostra). Por fim, transferiu-se 0,1 mL da solução inativada para o dispositivo de teste, seguindo-se uma nova incubação à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Registou-se o resultado, sendo considerado teste positivo a presença de duas linhas, uma linha na zona de amostra de teste e outra na zona de verificação de teste.

A deteção de *Salmonella spp.* foi realizada de acordo com a norma ISO 6579:2002, com recurso ao kit 1-2 Test (Método oficial AOAC 989.13). Trata-se de um método qualitativo rápido para a deteção de *Salmonella* em alimentos. Baseia-se na observação de *Salmonella* imobilizada num meio com anticorpos polivalentes (flagelares).

Após a incubação da amostra a 35 °C durante 24 horas, recolheu-se 0,1 mL e adicionou-se num dos lados do kit onde estava inserido o reagente de iodo-iodeto. Do outro lado do kit, adicionou-se o anticorpo. O resultado foi observado ao fim de 24 horas. A presença de *Salmonella* é descrita por uma banda branca em forma de U, resultado da ligação entre o antígeno e o anticorpo.

3.4. Caracterização morfológica e identificação molecular de populações microbianas

Após a quantificação microbiana, as colónias foram repicadas para meio de cultura fresco (PCA e MRS), para obtenção de culturas puras.

A identificação taxonómica dos isolados foi realizada utilizando abordagens morfológicas como moleculares. Inicialmente, os isolados foram agrupados em diferentes morfotipos, com base nas características morfológicas das colónias, tais como a cor, brilho, forma, margem, superfície, elevação e consistência. De cada morfotipo, selecionaram-se dois representantes para identificação molecular.

3.4.1. Identificação molecular dos isolados

Para os isolados obtidos procedeu-se à extração de DNA genómico, com o kit de extração *REDEExtract-N-Amp Plant PCR kit* (Sigma, Poole, UK), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram seguidamente amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se um termociclador *MyCycler (BioRad Hercules)*.

Na amplificação da região do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA nuclear ribossomal, foram utilizados dois pares de iniciadores oligonucleotídicos universais: TS1 e ITS4 para as leveduras (White et al., 1990); 27F e 534R para as bactérias (Lane, 1991; Muyzer et al., 1993). A mistura de reação continha os iniciadores oligonucleotídicos (0,4 µL de cada, à concentração de 10 mM), 2µL de tampão de PCR (10 mM), 0,4 µL dNTPs (10 mM), 2 µL DNA, 0,1 µL Taq polimerase (5 U/µL) e 14,7 µL de H₂O ultrapura para um volume final de 20 µL. Os ciclos de temperaturas utilizados na amplificação tiveram início com uma primeira desnaturação a 94 °C durante 3 min (1 ciclo); seguido de uma segunda desnaturação a 94 °C durante 30 s, emparelhamento entre 52 °C - 56 °C durante 50 s, extensão a 72 °C durante 2 min (35 ciclos); e uma extensão final 72 °C durante 10 min (1 ciclo).

3.4.2. Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose

A visualização e separação dos produtos de PCR foi realizada mediante eletroforese em gel de agarose (1,3%), em tampão TBE (1X) (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 Mm, pH 7,6), durante 30 minutos a uma intensidade de corrente de 80 V.

Dos produtos de PCR, 4 µL foram carregados nos poços com 2 µL de tampão de carregamento (6X) *Loading Dye Blue* (Bioron). Adicionalmente, foi colocado um marcador molecular de referência 1Kb *DNA Ladder* (Bioron), na quantidade recomendada pelo fabricante. Após a corrida, o gel foi corado numa solução aquosa de *GelRed™ Biotum* (3X), durante 30 minutos. A visualização das bandas de DNA foi conseguida pelo *ChemiDoc™ XRS+with Image Lab™ Software* (BioRad, Hercules).

3.4.3. Sequenciação e análise de sequências

Os produtos amplificados (~650 bp), foram purificados e sequenciados usando os serviços da *Macrogen Inc.* (Madrid, Espanha). As sequências de DNA foram analisadas com o software DNASTAR v.2.58, e a identificação dos isolados foi efetuada utilizando as bases de dados *NCBI-National Center for Biotechnology Information* e UNITE, realizando o algoritmo BLAST. A classificação taxonómica foi apresentada com base nos critérios descritos por Raja et al. (2017).

Para efeitos de preservação, todos os isolados identificados foram depositados na coleção de culturas do Centro de Investigação da Montanha (CIMO) da Escola Superior Agrária de Bragança.

3.5. Cálculos e tratamento estatístico

A análise estatística dos parâmetros físico-químicos foi realizada recorrendo ao software Minitab versão 14 (Pennsylvania, USA). Para analisar a normalidade e homogeneidade da variância foram utilizados os testes Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente. No caso em que não se observou normalidade e homogeneidade da variância aplicaram-se testes não-paramétricos, designadamente o Teste de Kruskal-Wallis. Quando os dados seguiram uma distribuição normal e se observou homogeneidade de variâncias, aplicou-se a ANOVA. Seguidamente, no caso de existirem diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey. Quando não se observou homogeneidade de

variâncias, aplicou-se a ANOVA-Welch. No caso de existirem diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$), aplicou-se o teste Post-hoc de Games-Howell.



4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

A evolução do perfil do processo fermentativo da azeitona de mesa Negrinha de Freixo nos três estados de maturação - verde, mista e preta - em salmoura com 0, 3, 6, 9 e 12 % de NaCl foi seguida através da análise de parâmetros físico-químicos (textura, pH e acidez titulável), bem como de parâmetros microbiológicos (contagem total de microrganismos e identificação molecular dos isolados).

A fermentação deu-se por finalizada aos 210 dias, onde foi ainda determinada a presença/ausência de microrganismos patogénicos.

4.1. Parâmetros físico-químicos

4.1.1. Análise do perfil de textura das azeitonas verdes, mistas e pretas ao longo da fermentação

Na Figura 6 encontram-se representados em diagramas Boxplot os resultados obtidos para a textura avaliada para os três tipos de azeitonas - verdes, mistas e pretas - durante a fermentação, quando sujeitas às diferentes concentrações de sal. Em termos gerais, observaram-se diferenças significativas entre os estados de maturação, tendo as azeitonas verdes apresentado os maiores valores de mediana para a dureza e mastigabilidade, e menores para a adesividade, elasticidade e coesividade. Cada um destes parâmetros serão analisados em mais pormenor à frente no texto. Observou-se também, que em alguns parâmetros avaliados da textura, o número de outliers foi bastante grande, como por exemplo na adesividade das azeitonas mistas, bem como na coesividade e mastigabilidade para os três índices de maturação, sugerindo que os frutos eram bastante heterogéneos em termos de textura.

Na Figura 7 encontram-se representados os parâmetros da textura avaliados ao longo da fermentação para as diferentes concentrações de sal, para cada um dos índices de maturação. No Anexo I também se encontram descritos os valores individuais (médias \pm desvio padrão) obtidos para os diferentes parâmetros avaliados e condições aplicadas, bem como os resultados obtidos do tratamento estatístico ao longo do tempo da fermentação.

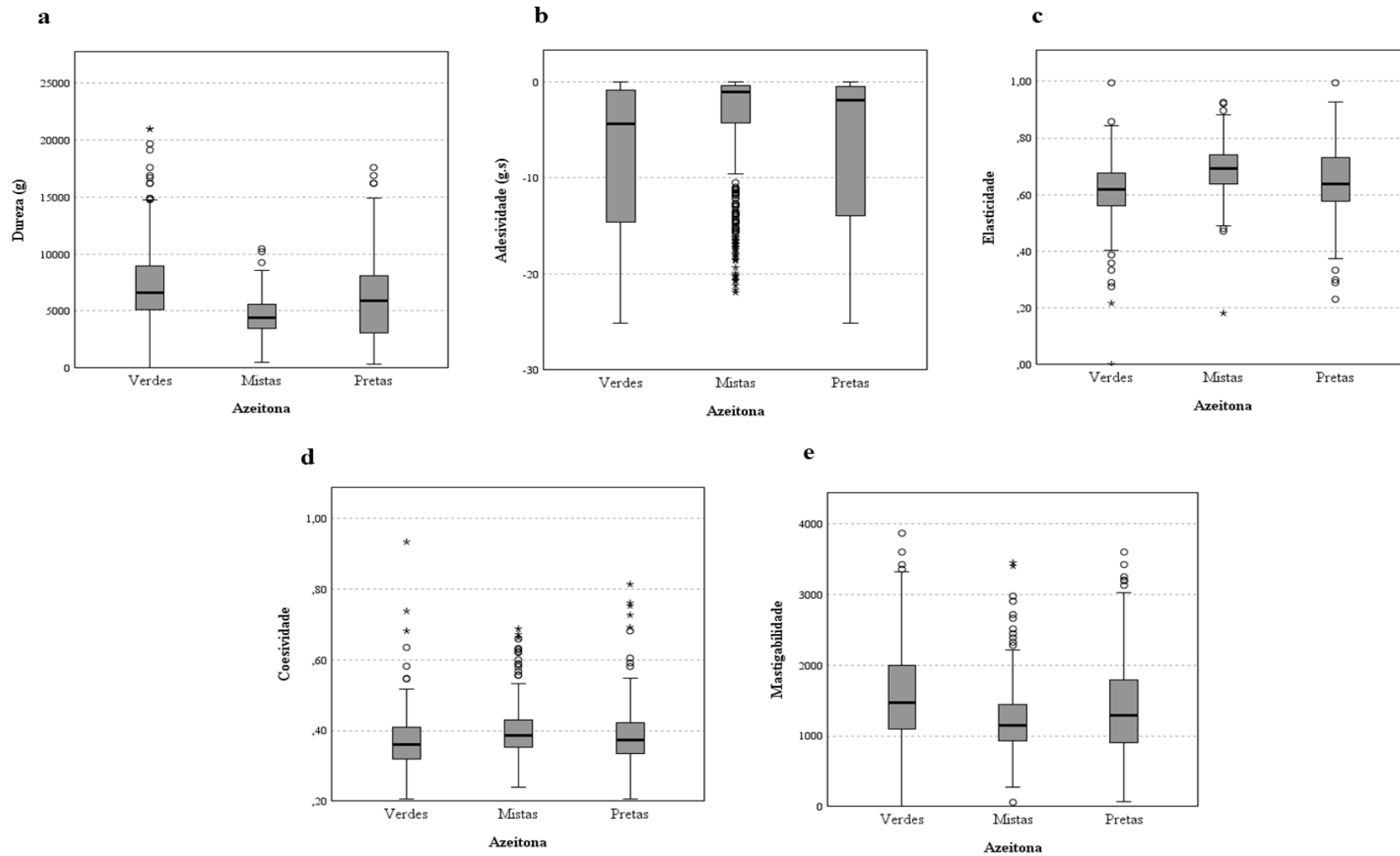


Figura 6. Parâmetros da textura: (a) Dureza (g), (b) Adesividade (g.s), (c) Elasticidade, (d) Coesividade, (e) Mastigabilidade.

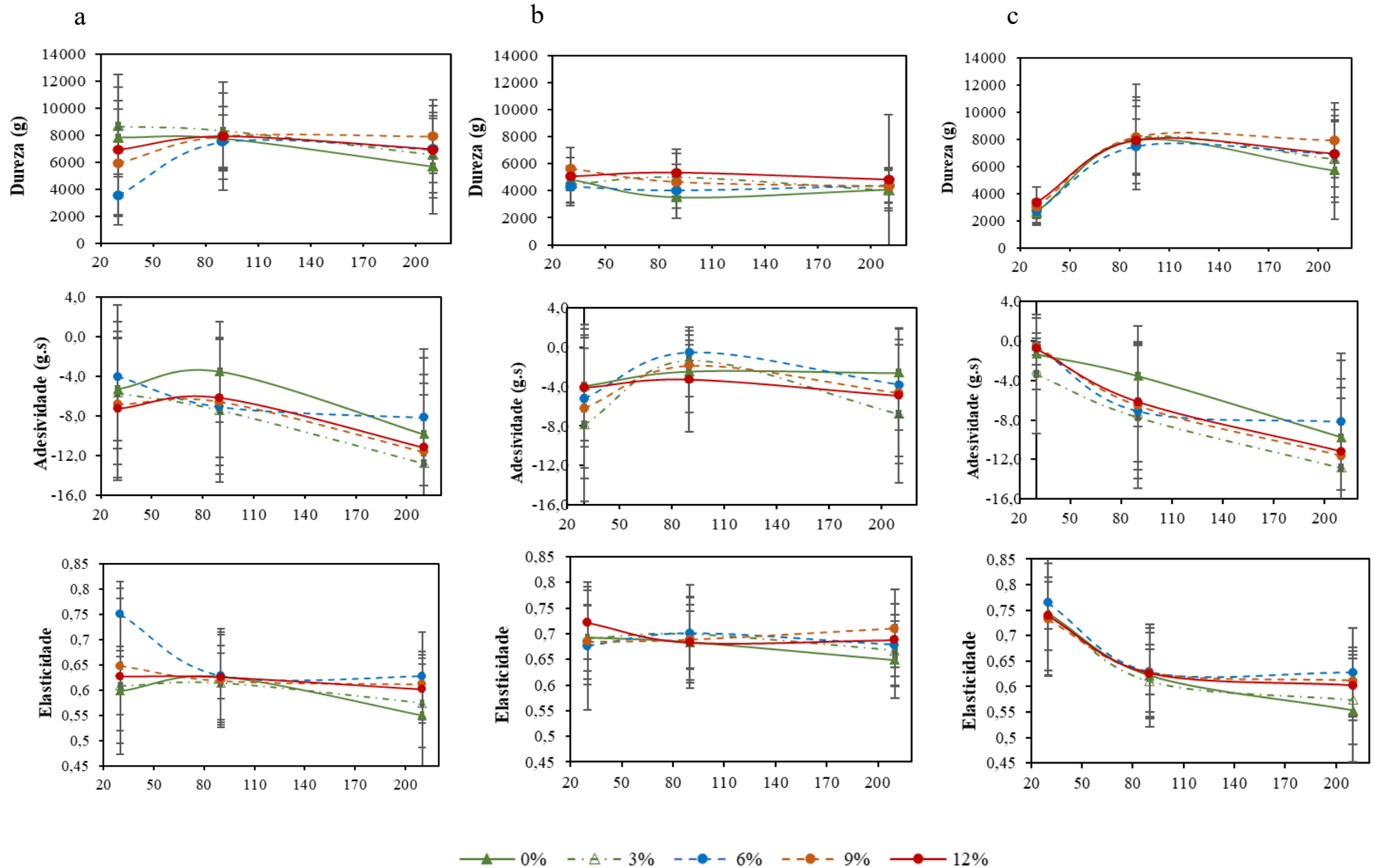


Figura 7. Evolução da dureza (g), adesividade (g.s), elasticidade, coesividade e mastigabilidade da azeitona verde (a), mista (b) e preta (c) ao longo do tempo de fermentação

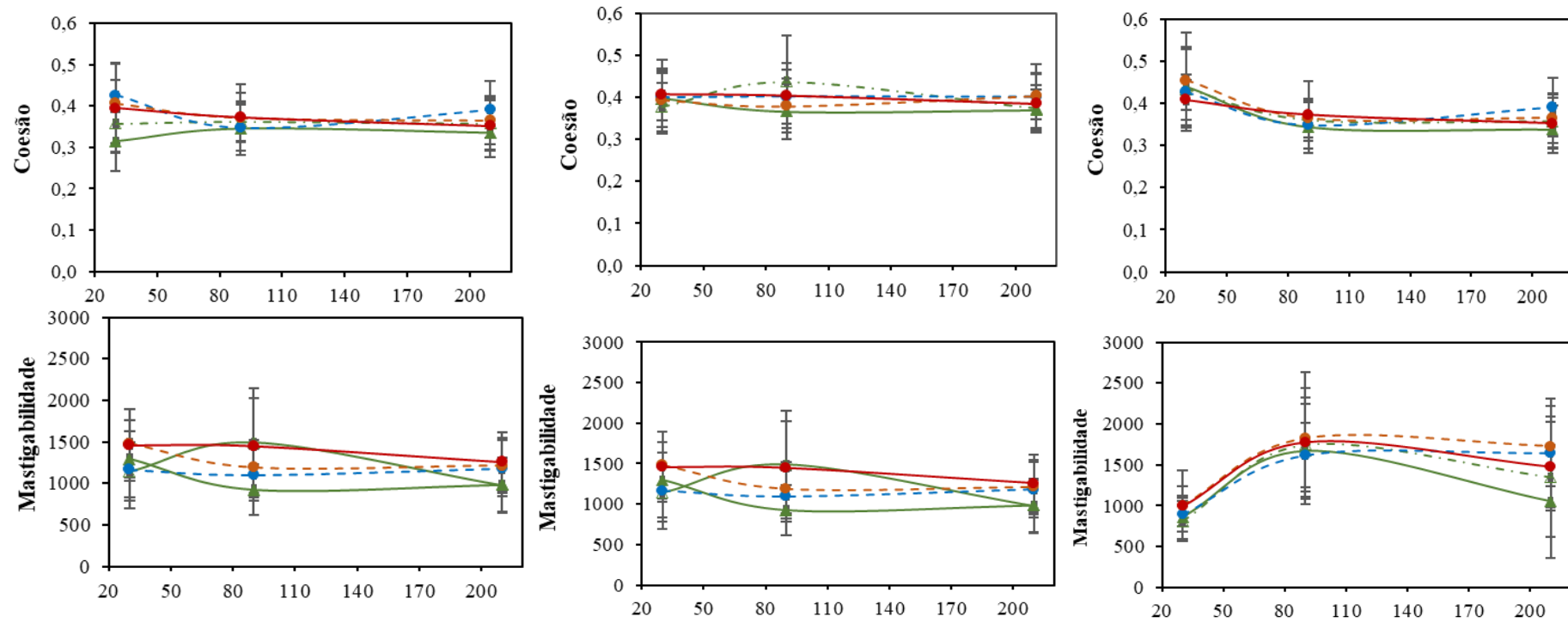


Figura 7. (cont.) Evolução da dureza (g), adesividade (g.s), elasticidade, coesividade e mastigabilidade da azeitona verde (a),mista (b) e preta (c) ao longo do tempo de fermentação.

A dureza ou firmeza da azeitona é uma das características organolépticas mais importantes, podendo resultar na rejeição da azeitona por parte do consumidor se esta não corresponder às suas expectativas (Saúde, 2014). Os atributos de qualidade da textura dos alimentos podem ser avaliados por análise sensorial ou por métodos instrumentais (Chen & Opara, 2013). A avaliação do perfil de textura usando instrumentos é de grande utilidade, sendo o teste de TPA um dos mais frequentemente utilizado. Este teste é também chamado o teste de duas “mordidas” devido ao facto do texturómetro imitar a ação da boca ao mastigar (Lanza & Amoruso, 2018).

Com base nos resultados obtidos através da análise instrumental pôde-se constatar que as azeitonas nos três índices de maturação, fermentadas em salmoura com diferentes concentrações de NaCl, apresentaram valores de dureza significativamente diferentes entre si. As azeitonas pretas exibiram os valores mais baixos no tempo inicial, comparado com as azeitonas verdes e mistas, o que era esperado, uma vez que as azeitonas ao amadurecerem vão perdendo rigidez. A dureza das azeitonas verdes pode estar relacionada com a presença do mineral cálcio, o qual se envolve em ligações cruzadas como polímeros presentes na parede celular, sendo a azeitona mais dura quanto maior for o teor de cálcio (Cardoso et al., 2007).

As azeitonas verdes apresentaram uma variação de dureza entre 3528 e 8684 g, em termos de valores médios, referente às concentrações de 6% e 3% de NaCl aos 30 dias, respetivamente. A concentração de 0% foi a que apresentou a média mais baixa de dureza após 210 dias de fermentação. Contudo, esse valor não foi significativamente diferente face às restantes concentrações de sal. Ao longo do tempo, as azeitonas verdes apresentaram um comportamento variável. Em algumas situações, ao comparar os 30 dias com os 210 dias, a dureza diminuiu significativamente (0 e 3% de NaCl) ou não se detetaram diferenças significativas (9 e 12% de NaCl). Nas azeitonas mistas, o comportamento foi mais uniforme, não tendo sido detetadas diferenças significativas aos 210 dias para as diferentes concentrações de sal. Para as azeitonas pretas, verificou-se um aumento significativo na dureza dos 30 para os 90 dias, atingindo o valor máximo de 8169 g em 9% de NaCl. No entanto, aos 90 dias não se observaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de sal. Aos 210 dias, só se observou uma diferença significativa entre os 0% e os 9% de NaCl, não se tendo determinado diferenças significativas entre os 0% e os 12% de NaCl. Este facto indica que o sal não teve um papel relevante ao nível da dureza. Em termos gerais, observando os três gráficos

constatou-se uma ligeira diminuição da dureza dos 90 para os 210 dias em algumas situações, mais evidentes nas azeitonas verdes e pretas, que pode ser devida à hidrólise de substâncias pécticas presentes na azeitona, fenómeno este que afeta a textura do fruto tornando-o menos duro (Bianchi, 2003). A pectina tem como função manter unidas as células dos tecidos (Lanza & Amoruso, 2018). Na presença de cálcio, estabelecem-se ligações entre os grupos carboxilo das cadeias poligalacturónicas entre si ou com celulose e hemiceluloses, originando uma estrutura reticular de cadeias pécticas, traduzindo-se numa maior rigidez e compactação dos tecidos (Lanza & Amoruso, 2018). Assim, o armazenamento da azeitona até 210 dias em salmoura com diferentes concentrações de sal, não afetou de forma muito evidente a sua dureza. Estes resultados são diferentes dos reportados por Fadda et al., (2014), os quais observaram um aumento na dureza em azeitonas verdes quando a concentração de NaCl aumentou dos 4% para os 7%.

Relativamente à adesividade do fruto, as azeitonas verdes e pretas, apresentaram um comportamento mais semelhante entre si do que com as mistas, com exceção da concentração de NaCl a 12%, tendo-se observado um decréscimo significativo ao fim de 210 dias de fermentação, não existindo diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes concentrações de sal. As azeitonas mistas apresentaram um acréscimo aos 90 dias, atingindo valores máximos de -1 g.s nas concentrações de sal de 3% e 6%. Contudo após os 210 dias, a adesividade determinada nestas azeitonas não foi significativamente diferente à determinada no tempo 30, não se tendo também detetado diferenças significativas entre as concentrações de sal. Novamente, estes resultados sugerem que o NaCl não afetou este parâmetro.

Quanto à elasticidade do fruto, esta permite avaliar a forma como o produto recupera após ter sido deformado na primeira compressão, tendo, em termos gerais, os valores médios variado entre 0,55 e 0,76. As azeitonas verdes apresentaram um comportamento bastante semelhante ao longo do tempo para as várias concentrações de sal, exceto a concentração de NaCl a 6% no tempo de 30 dias. Contudo, aos 90 dias não se verificaram diferenças significativas entre as concentrações em estudo, sugerindo que a situação reportada aos 30 dias foi uma situação esporádica, resultado da heterogeneidade da amostra. Nas azeitonas mistas não se observaram diferenças significativas ao longo dos períodos de amostragem, ao contrário do observado nas azeitonas pretas. Nestas, os valores de elasticidade diminuíram significativamente entre 30 e os 90 dias. Após 210 dias de fermentação observaram-se diferenças significativas entre algumas concentrações de sal,

no entanto sem comportamento definido, uma vez que as amostras relativas à concentração de 0% de sal não apresentaram valores de elasticidade significativamente diferentes das de 12% de sal.

Em relação à coesividade do fruto, que avalia o quanto um produto suporta uma segunda deformação relativamente à sua resistência durante a primeira deformação, o comportamento foi pouco variável para os três tipos de azeitonas (verdes, mistas e pretas), tendo-se verificado um ligeiro decréscimo nas azeitonas pretas após 90 e 210 dias quando comparados com os 30 dias. Tal como verificado para o parâmetro anterior, após 210 dias de fermentação observaram-se diferenças significativas na coesividade entre algumas concentrações de sal. Contudo, ao comparar a coesividade da concentração de 0% de sal não se obtiveram valores significativamente diferentes dos determinados para 12% de sal, sugerindo novamente que o NaCl não afetou de forma significativa a coesividade do fruto.

No que diz respeito à mastigabilidade do fruto, observou-se um comportamento semelhante entre as azeitonas verdes e mistas, distinguindo-se das pretas. Nas azeitonas verdes e mistas, os valores de mastigabilidade variaram pouco ao longo do tempo e entre as concentrações de sal. Relativamente às azeitonas pretas, observou-se um aumento neste parâmetro após 90 dias, possivelmente resultado do aumento da dureza, uma vez que a mastigabilidade resulta do produto entre a dureza, coesividade e a elasticidade. A dureza. Contudo, após 210 dias, não se observaram diferenças significativas entre os 0% e os 12% de sal, sugerindo que este componente não afetou de forma significativa a mastigabilidade.

4.1.2. Evolução do pH da salmoura e da polpa do fruto ao longo da fermentação

Na Figura 8 encontram-se descritos os resultados obtidos para o pH avaliado para os três tipos de azeitonas (verdes, mistas e pretas) e respetivas salmouras, quando sujeitas a diferentes concentrações de sal e tempos de fermentação. Em termos gerais não se observaram diferenças significativas entre os valores de pH determinados nas azeitonas nos três estados de maturação ($p=0,106$). Pelo contrário, no que diz respeito à salmoura, observaram-se diferenças significativas entre os valores de pH determinados nas salmouras das azeitonas pretas e azeitonas verdes ($p=0,012$). Deve ser referido que na salmoura se observou uma maior variação nos valores de pH, com exceção das azeitonas pretas.

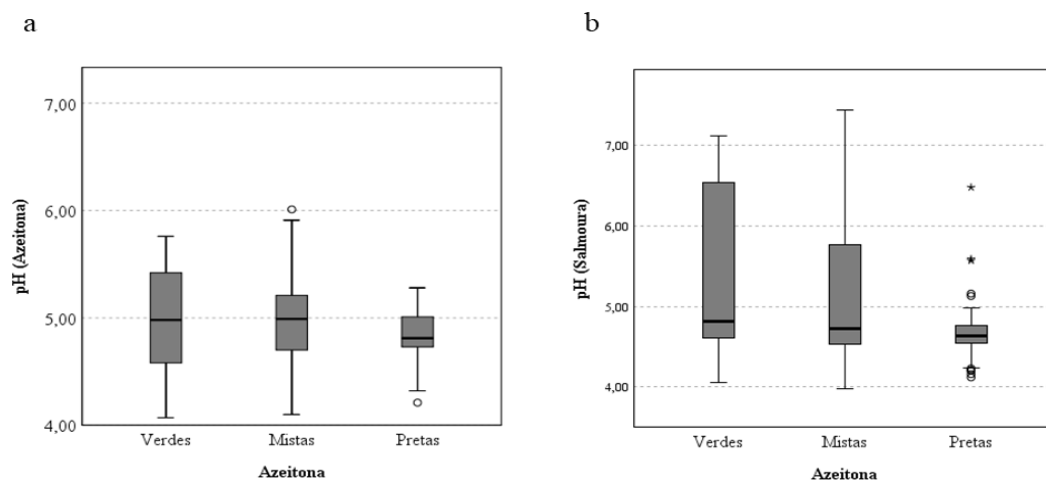


Figura 8. Gráficos Boxplot para os valores de pH determinados na azeitona (a) e na salmoura (b) em relação aos índices de maturação.

Na Figura 9 encontram-se os resultados do pH ao longo da fermentação para as diferentes concentrações de sal, para cada um dos índices de maturação. Observou-se que os valores de pH das diferentes salmouras, de uma forma geral foram aumentando significativamente com o decorrer da fermentação, variando entre 3,99 (salmoura com 3% NaCl) na fase inicial, e 7,31 (salmoura com 0% NaCl) na fase final (Figura 9 I). Aos 210 dias, a salmoura das azeitonas mistas foi a que registou valores de pH mais altos (7,31), seguindo-se a salmoura de azeitonas verdes (7,08) e pretas (5,73) (Figura 9 I - a, c, e). Estes resultados foram obtidos nas concentrações mais baixas de sal (0% e 3%). Para as concentrações mais altas (6%, 9% e 12%), as salmouras registaram valores de pH que variaram entre 4,62 e 6,70. Os resultados demonstraram que salmouras com concentrações de sal mais altas (9 e 12% de NaCl) apresentaram menores subidas de pH.

Em algumas situações, o período da fermentação onde se observou algum decréscimo nos valores pH foi entre os 30 e os 90 dias, atingindo um valor mínimo de 4,20 na salmoura de azeitonas verdes, 4,52 na salmoura de azeitonas mistas e 4,53 na salmoura de azeitonas pretas. Durante este período, o sal estimula a atividade microbiana, e o consumo de matérias fermentáveis conduz à fermentação láctica, onde a produção de ácidos permite uma descida do pH (Kiai et al., 2020). Após este período, os valores de pH aumentaram até ao final da fermentação.

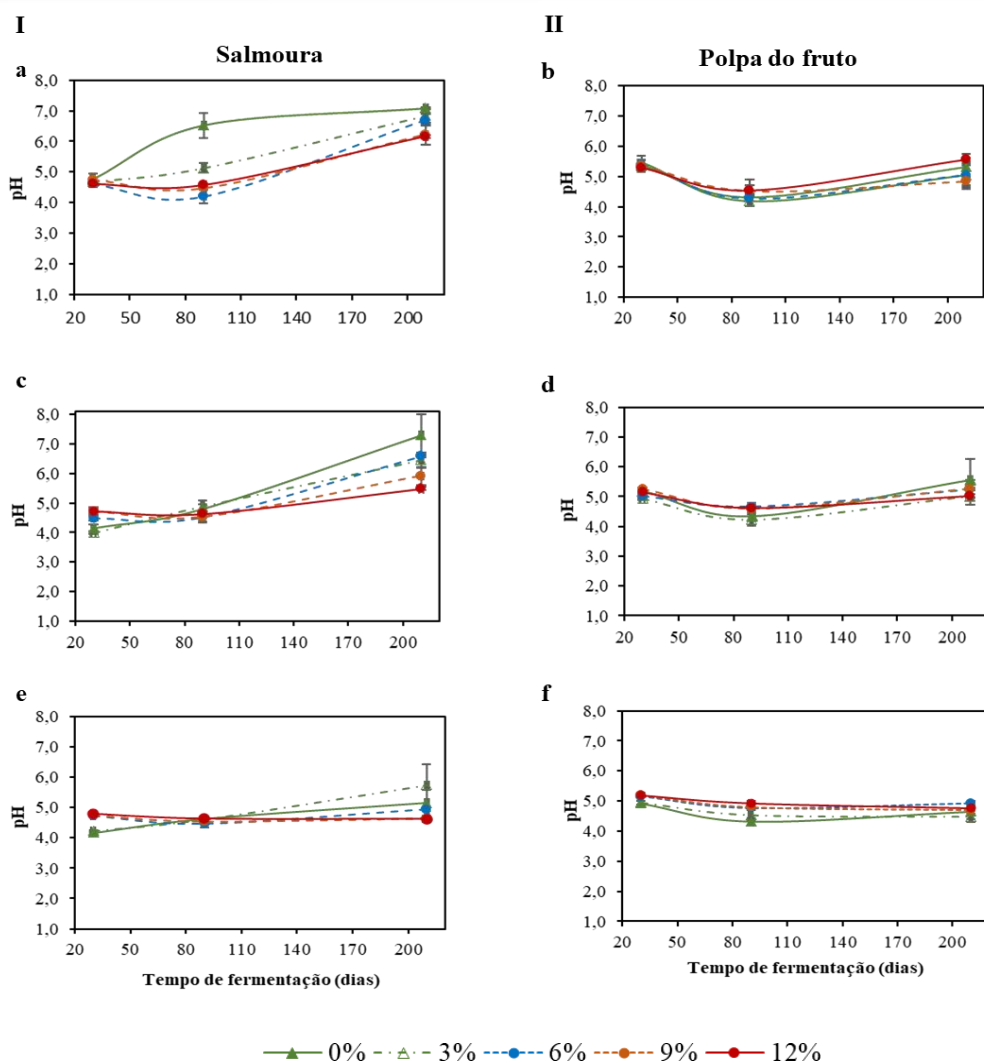


Figura 9. Evolução do pH na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação; verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f), quando sujeitas a diferentes salmouras (0, 3, 6, 9 e 12% de NaCl) durante 210 dias de fermentação. Os valores representam a média da análise em triplicado \pm desvio padrão.

Estes resultados mostram que salmouras com concentrações mais altas de sal (9% e 12% de NaCl) apresentam menores variações de pH. Contudo, em algumas situações (principalmente nas azeitonas verdes e mistas) pode-se observar um aumento de pH ao longo da fermentação, o que é indesejável por questões de segurança alimentar. Neste estudo, entre as fermentações realizadas, a salmoura de azeitonas pretas foi a que

apresentou valores de pH mais baixos durante todo o processo fermentativo e em todas as concentrações de sal testadas. Isto sugere uma relação entre o índice de maturação dos frutos e a disponibilidade de ácidos orgânicos, que conduz à diminuição dos valores de pH.

Considerando que a fermentação natural é espontânea e lenta, que decorre durante vários meses, é importante que os produtores de azeitona de mesa monitorizem este parâmetro e que apliquem, quando necessário, a adição de agentes acidificantes, como por exemplo ácido láctico ou ácido cítrico à salmoura, de forma a regular as mudanças de pH que possam ocorrer. De referir que alguns deles já o fazem de forma empírica, demonstrando este trabalho a importância do controlo do pH do processo fermentativo.

Em fermentações realizadas com azeitonas mistas Negrinha de Freixo em salmoura de 4,5 a 6% de NaCl, e ácido láctico (3mL/kg de azeitona) como regulador de acidez, Pereira et al. (2015) verificaram que os valores de pH diminuíram durante o processo, atingindo um mínimo de 3,46 ao fim de 149 dias. O decréscimo dos valores de pH em diferentes salmouras acidificadas com ácido láctico 0,1% (v/v) e vinagre 0,5% (v/v), (6%, v/v, de ácido acético), recorridas num período de 187 dias, também foi observado em fermentações naturais realizadas com azeitonas pretas da variedade Kalamata (Bonatsou et al., 2018). Similarmente, Poiana & Romeo (2006) colocaram azeitonas Sicilianas em salmouras acidificadas a pH=4 para facilitar e potenciar o crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL).

Em termos gerais, no presente trabalho foi possível verificar que para se garantirem valores de pH próximos de 4,0 (valor que confere segurança ao produto), o nível de acidez na salmoura e conseqüente o pH, devem ser monitorizados regularmente, pois são de extrema importância no processo fermentativo, uma vez que ao não adicionar agentes de acidificação, o processo pode atingir valores altos de pH, não sendo possível atingir o valor de referência.

No que se refere à variação dos valores de pH na polpa do fruto, verificou-se um comportamento semelhante ao observado nas salmouras (Figura 9 II), com uma menor variação entre as diferentes concentrações de sal. Após o equilíbrio, para as concentrações de sal de 6%, 9% e 12%, os valores de pH das salmouras foram muito próximos aos das soluções aquosas da polpa dos frutos. Na polpa dos frutos observou-se uma diminuição do pH entre os 30 e 90 dias de fermentação, com valores entre 5,46 e 4,20 (Figura 9 II - b, d, f). No final da fermentação os frutos apresentaram valores de pH mais baixos

comparativamente aos registados nas respetivas salmouras, atingindo um máximo de 5,57. A evolução do perfil de pH foi semelhante para os diferentes índices de maturação, destacando-se as azeitonas pretas que registaram valores de pH mais baixos no final da fermentação (4,47). Os resultados obtidos indicam que o perfil de pH na polpa é pouco influenciado pela concentração de sal e o estado de maturação dos frutos. Azeitonas de mesa com pH acima 4,5 são consideradas perecíveis e devem ser submetidas a um processo de conservação que retarde o crescimento de microrganismos patogénicos (Perricone et al., 2010).

No presente estudo, os valores de pH obtidos na salmoura e na polpa do fruto, estão acima dos valores máximos recomendados na Norma Comercial Aplicada a Azeitonas de Mesa (COI, 2004). Segundo esta norma, na fermentação natural os valores de pH deveriam atingir um máximo de 4,3 no final da fermentação, permitindo assim a preservação das azeitonas de mesa contra os processos de deterioração e inibição do crescimento de microrganismos patogénicos.

Este estudo foi realizado em condições laboratoriais e os resultados obtidos são de extrema importância pelo facto de demonstrar a necessidade de se monitorizar este parâmetro e de serem adicionados agentes acidificantes ao longo do processo, de modo a se obter valores de pH dentro dos limites estabelecidos.

4.1.3. Acidez titulável da salmoura e polpa do fruto ao longo da fermentação

Na Figura 10 encontram-se descritos os resultados obtidos para a acidez titulável avaliada para os três tipos de azeitonas (verdes, mistas e pretas). Na polpa da azeitona não se observaram diferenças significativas entre os estados de maturação ($p=0,068$), obtendo-se distribuições semelhantes. Pelo contrário, na salmoura observaram-se diferenças significativas entre os índices de maturação, distinguindo-se a salmoura das azeitonas verdes face à das azeitonas mistas ($p=0,009$) e pretas ($<0,001$). Já entre a salmoura das azeitonas mistas e pretas, não se observaram diferenças significativas ($p=0,127$) ao nível da acidez titulável.

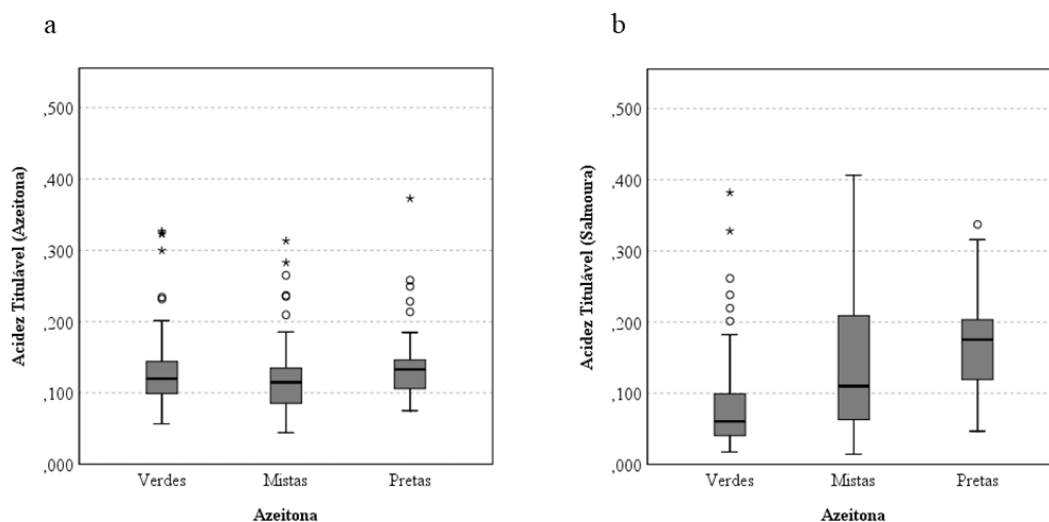


Figura 10. Gráfico Boxplot para a acidez titulável determinada na azeitona (a) e na salmoura (b) em relação aos índices de maturação.

Na Figura 11 encontra-se representada a evolução da acidez titulável nas salmouras e polpa do fruto ao longo da fermentação, para as diferentes concentrações de sal. Observou-se que a acidez titulável na salmoura aumentou de forma progressiva até ao 90º dia de fermentação nas salmouras de 6, 9 e 12 % de NaCl (Figura 11 I - a,c,e). Este aumento é mais acentuado na salmoura de azeitonas verdes atingindo percentagens de ácido láctico que variaram entre 0,17 (para 12% de NaCl) e 0,32 (para 6% de NaCl). Este incremento poderá estar relacionado com a libertação de ácidos orgânicos, como o ácido málico, láctico, acético, succínico e cítrico pelas BAL e leveduras, à medida que absorvem e metabolizam açúcares (por exemplo, glicose e frutose) concedidos pelas azeitonas. Os referidos ácidos são frequentemente descritos em salmouras de azeitonas verdes (Anagnostopoulos et al., 2020; Chorianopoulos et al., 2005).

Recentemente, num estudo realizado por (Reis et al., 2022), obteve-se um perfil de acidez titulável semelhante nos primeiros 3 meses de fermentação de azeitonas de mesa da variedade portuguesa Cobranchosa proveniente de sete produtores independentes da região de Trás-os-Montes. Contudo, estes produtores podem ter realizado ajustes de pH, garantindo uma maior uniformidade nos valores.

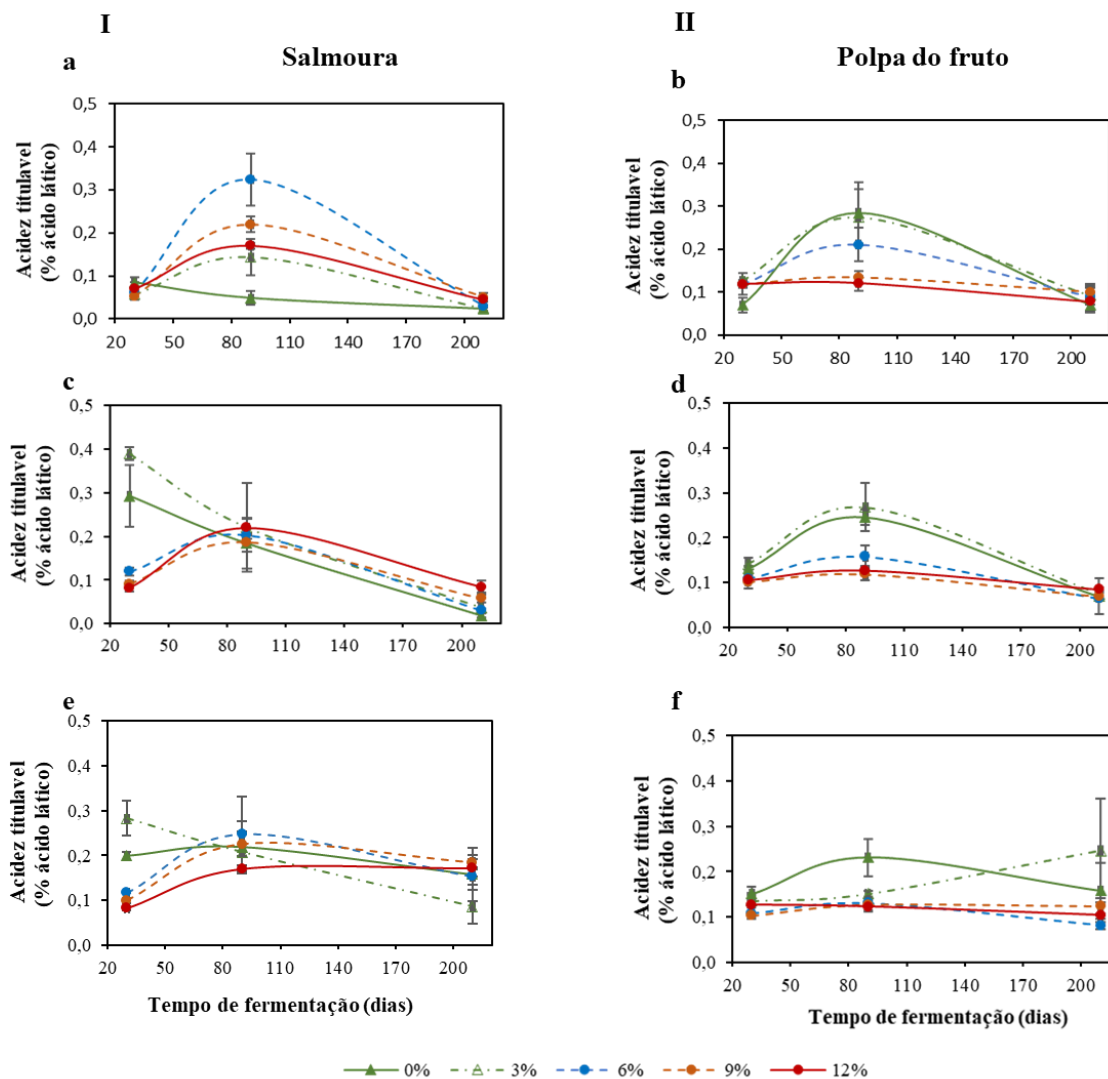


Figura 11. Evolução da acidez titulável na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação; verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f), sujeitas a diferentes salmouras (0%, 3%, 6%, 9%, e 12% de NaCl) durante 210 dias de fermentação. Os valores representam a média da análise em triplicado \pm desvio padrão.

Nas fermentações com 0% e 3% de NaCl a evolução da acidez titulável foi relativamente diferente, destacando-se a salmoura de azeitonas mistas, em que ocorreu um decréscimo na percentagem de ácido láctico do início até ao final do processo fermentativo (Figura

11 I-c). Contudo, para todas as salmouras avaliadas verificou-se que a partir dos 90 dias de fermentação, a acidez titulável diminuiu acentuadamente até aos 210 dias, atingindo valores entre 0,02% e 0,14 % de ácido láctico.

Relativamente à evolução da acidez titulável ao nível da polpa dos frutos, verificaram-se resultados concordantes com os obtidos nas salmouras (Figura 11 II - b, d, f). As azeitonas verdes foram as que apresentaram maiores percentagens de ácido láctico aos 90 dias de fermentação para todas as concentrações testadas, seguindo-se as azeitonas mistas e pretas.

Constatou-se que as mudanças de pH refletem, em parte, os valores da acidez titulável expressa em % de ácido láctico; pois quanto menor o pH, maior a acidez. Acidez desenvolvida e a queda de pH são fatores determinantes para o sucesso da fermentação e segurança do produto final (Chorianopoulos et al., 2005). No sentido de regular estes parâmetros, alguns investigadores sugerem a adição de suplementos de glucose ou sacarose (Chorianopoulos et al., 2005) ou substâncias reguladoras de acidez (Bonatsou et al., 2018), bem como, adição de culturas iniciadoras de BAL e leveduras (Lanza et al., 2021) no início do processo fermentativo.

4.2. Parâmetros microbiológicos

4.2.1. Contagem total de microrganismos na salmoura e na polpa do fruto durante a fermentação

A dinâmica microbiana foi avaliada através da contagem total de microrganismos presentes nas salmouras com diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 6%, 9% e 12%) e na polpa dos frutos durante 30 dias (Figura 12), 90 dias (Figura 13) e 210 dias (Figura 14). Os resultados obtidos descrevem a variação da população de microrganismos mesófilos, BAL, bolores e leveduras.

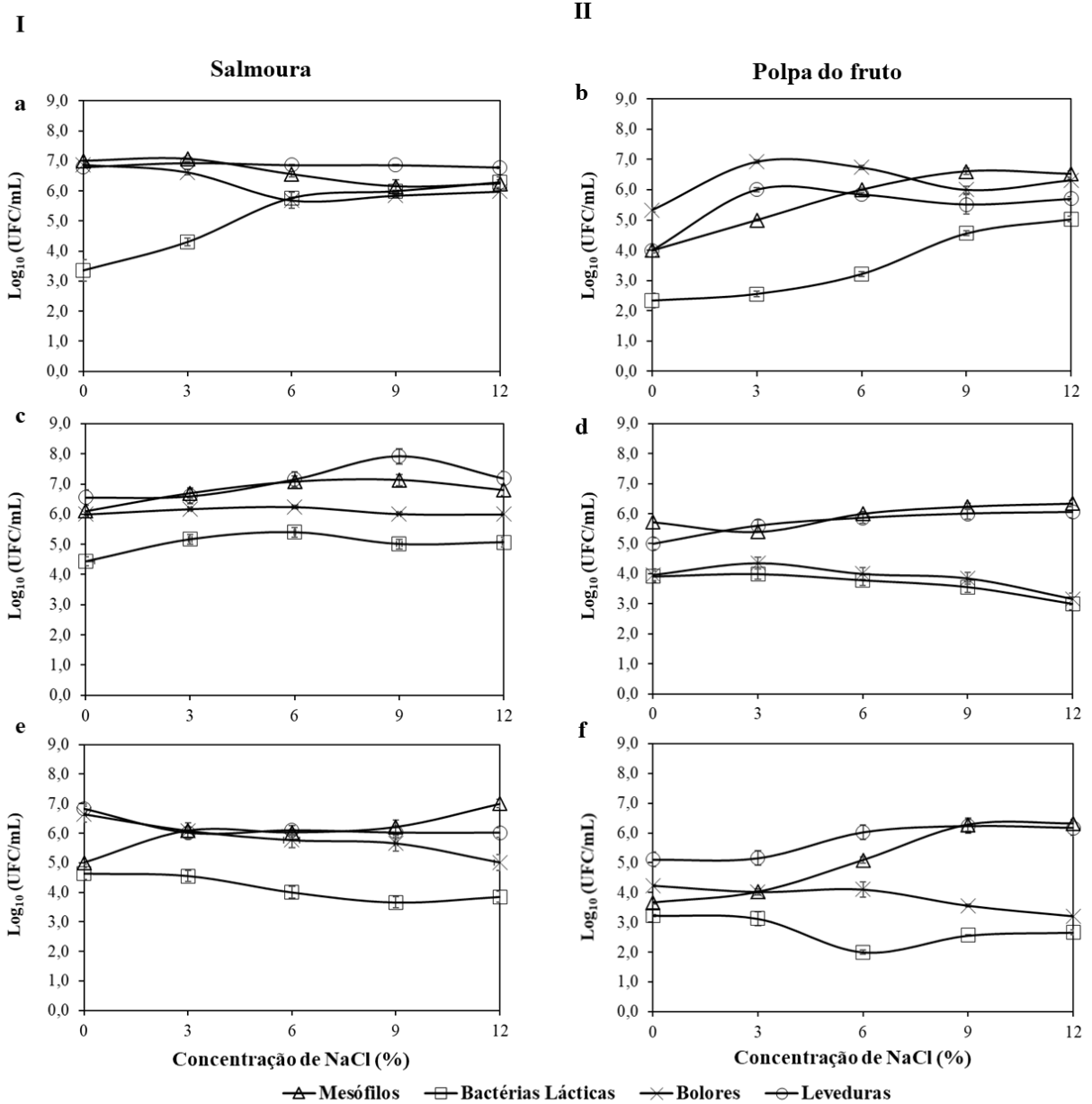


Figura 12. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), bactérias lácticas (\square), bolores (x) e leveduras (o) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 30 dias com diferentes concentrações de NaCl (%).

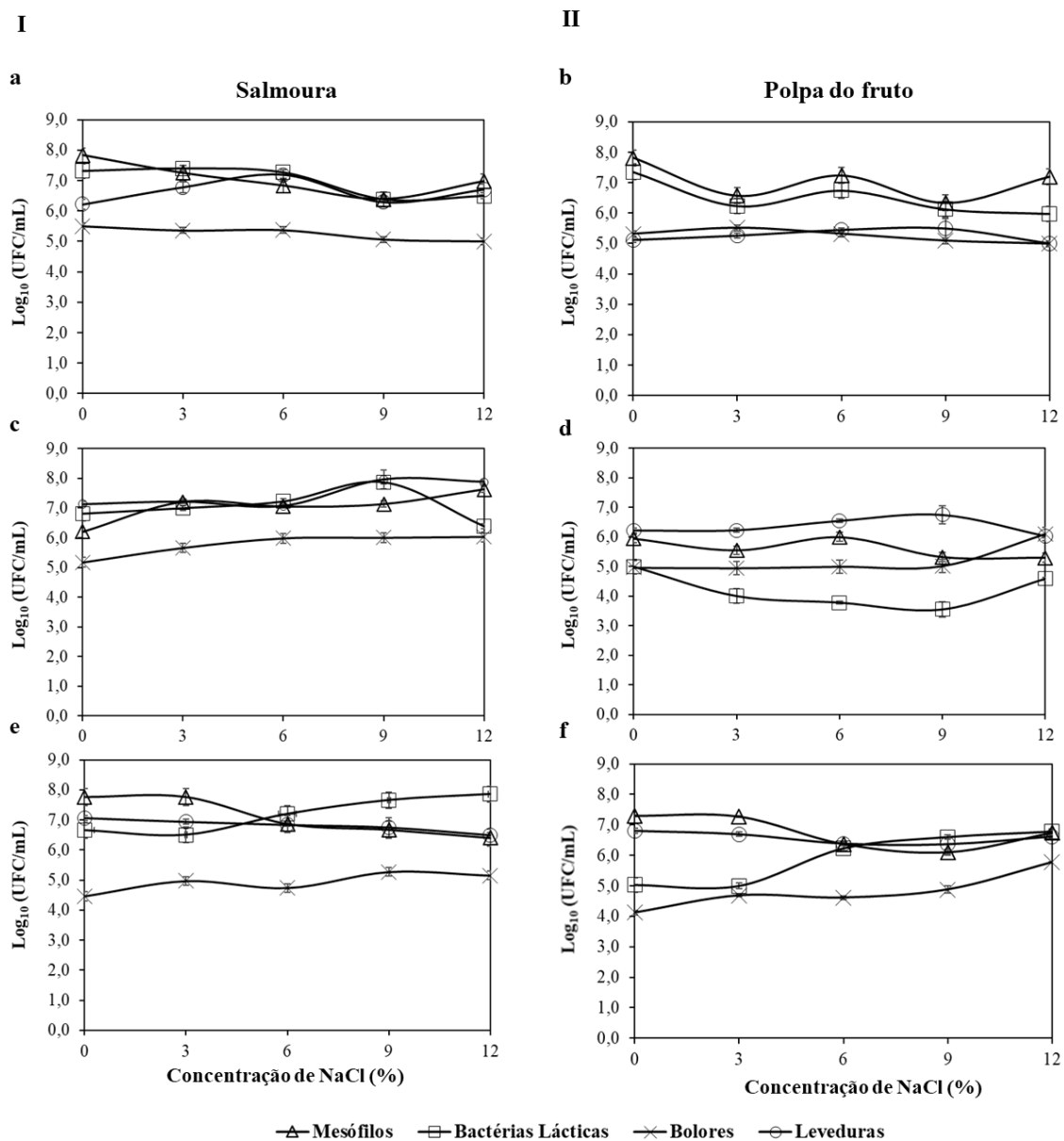


Figura 13. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), bactérias lácticas (\square), bolores (x) e leveduras (o) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 90 dias com diferentes concentrações de NaCl (%).

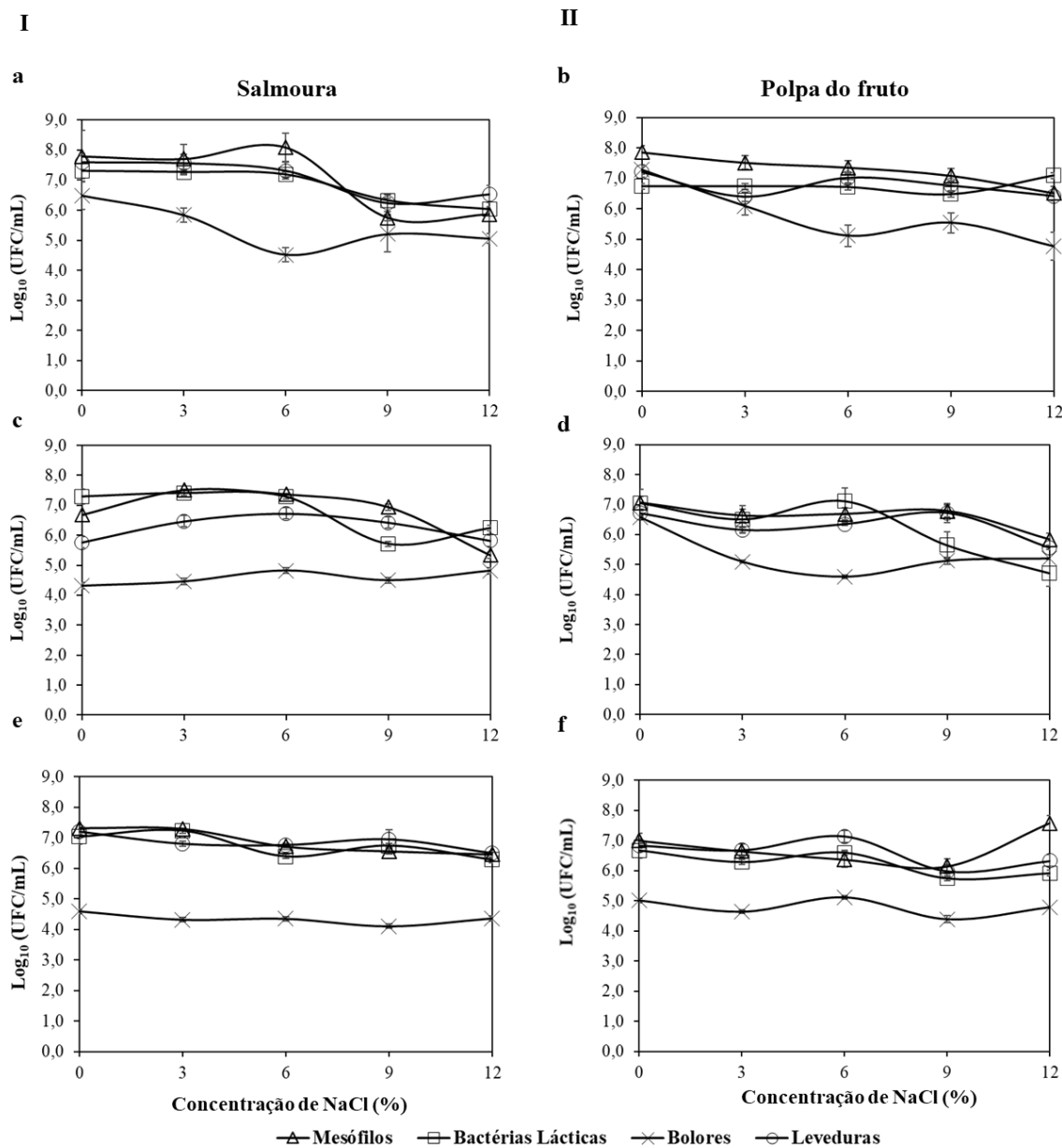


Figura 14. Contagem total de microrganismos mesófilos (Δ), bactérias lácticas (\square), bolores (\times) e leveduras (\circ) presentes na salmoura (I) e na polpa do fruto (II) de azeitonas verdes (a, b), mistas (c, d) e pretas (e, f) em fermentações de 210 dias com diferentes concentrações de NaCl (%).

Mudanças claras nas comunidades bacterianas e fúngicas foram observadas durante as fermentações. Verificou-se uma certa oscilação nas contagens para todos os microrganismos pesquisados desde o início da fermentação até à fase final do processo (Figuras 12, 13, 14), facto que poderá estar diretamente relacionado com as diferenças nas concentrações de sal utilizadas nas salmouras. A resposta de azeitonas Conservolea naturalmente pretas em salmoura, com diferentes níveis de sal (4%, 6% e 8%), foi estudada por Tassou et al. (2002) usando o método tradicional de fermentação anaeróbia. As leveduras foram o grupo dominante em salmoura com 8% de NaCl. Pelo contrário, a dominância de BAL ocorreu durante a fermentação em salmouras de 6% de NaCl, enquanto que, o crescimento foi retardado em salmouras com 8% de NaCl.

Para os primeiros 30 dias de fermentação, as contagens de microrganismos mesófilos situaram-se entre 6,15 e 7,07 Log₁₀ UFC/mL (salmouras com azeitonas verdes); 6,11 e 7,14 Log₁₀ UFC/mL (salmouras com azeitonas mistas), e 5,00 e 7,00 Log₁₀ UFC/mL (salmouras com azeitona preta) (Figura 12 I). A população de BAL registou valores de contagens mais baixos, situados entre 3,35 e 6,30 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas verdes), 4,44 e 5,40 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas mistas) e por fim 3,66 e 4,63 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas pretas).

No que respeita à população de bolores e leveduras, a evolução das contagens foi muito semelhante para as várias concentrações de sal testadas. Ainda assim, as leveduras foram a população predominante. Estas atingiram valores de contagens mais altos situados entre 7,15 e 7,95 Log₁₀ UFC/mL, respetivamente, nas concentrações de 6 e 9% de NaCl (Figura 12c).

Relativamente à polpa dos frutos, observou-se que a abundância dos diferentes grupos de microrganismos foi menor comparativamente com as respetivas salmouras (Figura 12 II). Esta diminuição poderá estar relacionada com a maior quantidade de compostos fenólicos presentes na polpa do fruto, face à salmoura, com propriedades antimicrobianas, podendo naturalmente inibir o desenvolvimento destes microrganismos (Malheiro et al., 2014). Os microrganismos que registaram contagens mais baixas foram as BAL e os bolores na polpa das azeitonas mistas e pretas (Figura 12-d, f). A população de mesófilos apresentou um perfil oposto, sendo caracterizado por um aumento crescente para concentrações de NaCl mais altas, variando entre 3,66 e 6,32 Log₁₀ UFC/g.

Aos 90 dias de fermentação as diferentes salmouras apresentavam maior densidade microbiana (Figura 13 I). As contagens máximas obtidas para os mesófilos foram; 7,84

Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas verdes, 0% de NaCl); 7,63 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas mistas, 12% de NaCl) e 7,76 Log₁₀ UFC/mL (salmoura azeitonas pretas, 0% e 3% de NaCl). Ao nível das BAL observou-se um incremento nos valores das contagens máximas, que variaram entre 7,40 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas verdes, 3% NaCl); 7,78 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas mistas, 9% NaCl) e 7,86 Log₁₀ UFC/mL (salmoura de azeitonas pretas a 12% de NaCl).

Um estudo sobre as implicações da redução de NaCl no perfil de fermentação de azeitonas pretas naturais Conservolea foi realizado anteriormente por Panagou et al. (2011). Embora este estudo tenha decorrido num período de fermentação mais curto, foi verificado que a população de BAL em salmoura a 8% de NaCl cresceu rapidamente atingindo um máximo de 7,6 log₁₀ UFC/mL e permaneceu inalterado ou apresentou uma ligeira queda até o final do processo (50 dias de fermentação).

A população de bolores manteve um perfil relativamente constante para todas as salmouras. Por sua vez, as leveduras registaram contagens mais altas na salmoura das azeitonas mistas para 9 e 12% de NaCl.

A dinâmica da flora microbiana na polpa das azeitonas pretas foi muito semelhante à observada na respetiva salmoura. Contudo, os registos das contagens para todos os microrganismos apresentaram valores mais baixos (Figura 13 II - f). O comportamento observado na polpa de azeitonas verdes e mistas já se distinguiu mais face à salmoura. De referir que os diferentes índices de maturação originaram distintos crescimentos dos microrganismos, tendo nas azeitonas verdes, os mesófilos e as bactérias lácticas sido os mais abundantes; nas azeitonas mistas foram as leveduras, seguidas pelos mesófilos; e nas azeitonas pretas foram os mesófilos, seguidos de leveduras e bactérias lácticas para as concentrações de sal de 6%, 9% e 12%. A influência da maturação dos frutos e da concentração de sal de azeitonas de mesa Arbequina no processamento microbiano, foi também observado por Hurtado et al. (2009).

Quando o final da fermentação foi alcançado (210 dias) (Figura 14 I e II), as salmouras das azeitonas verdes e mistas apresentaram maiores flutuações comparativamente com a salmoura das azeitonas pretas. Os mesófilos, em conjunto com as leveduras e BAL dominaram o processo fermentativo até ao final da fermentação. Ao comparar o valor das contagens obtido para as leveduras na salmoura a 6% NaCl de azeitonas mistas (6,73 Log₁₀ UFC/mL) verificou-se que o mesmo está muito próximo dos resultados obtidos anteriormente por Pereira et al. (2015) em salmouras de 7% NaCl.

Os bolores foram os microrganismos que menores contagens apresentaram tanto ao nível das salmouras como nos respetivos frutos (Figura 14 I e II).

Salvo raras exceções (bolores), os resultados obtidos neste trabalho sugerem que ao aplicar diferentes concentrações de sal, a flora microbiana obtida no final da fermentação (210 dias) foi bastante semelhante para as concentrações de sal testadas e índices de maturação. Este facto indica que a percentagem de sal e o índice de maturação não afetaram de forma muito significativa a flora presente na polpa do fruto no final da fermentação.

4.2.2 Descrição dos isolados obtidos no final do processo fermentativo

Após a quantificação microbiana e obtenção de culturas puras, bactérias e leveduras foram observadas ao microscópio e avaliadas morfológicamente. Para os isolados de leveduras foi considerada a metodologia convencional de Yarrow (1998). Características morfológicas, tais como, diâmetro, forma, margem, elevação, cor e transparência foram avaliadas. Considerando as semelhanças, as placas foram agrupadas, e de cada morfotipo três isolados foram identificados molecularmente. A Figura 15 mostra algumas características macroscópicas de isolados de leveduras e bactérias ácido lácticas.

O resultado da sequenciação revelou uma complexa diversidade microbiana. Na Tabela 5 encontra-se descrita a abundância das espécies de leveduras e bactérias ácido lácticas identificadas nas salmouras suplementadas com diferentes concentrações de NaCl, e na polpa de azeitonas verdes, mistas e pretas no final do processo fermentativo.

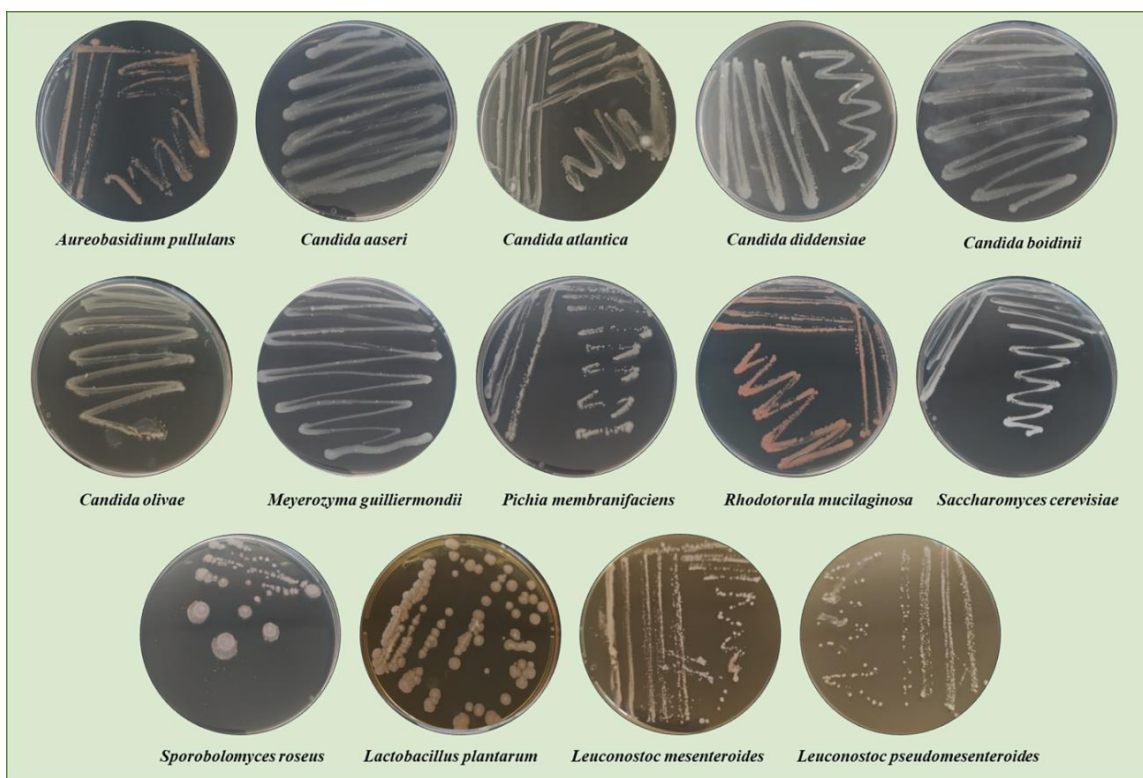


Figura 15. Características macroscópicas de isolados de leveduras e bactérias ácido lácticas.

Um total de 1909 isolados de leveduras foram identificados, sendo 1274 nas salmouras e 635 na polpa dos frutos. Os géneros encontrados foram: *Aureobasidium*, *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Saccharomyces*. Dentro destes géneros, destacam-se as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Candida aaseri*, *C. atlantica*, *C. boidinii*, *C. diddensiae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Sporobolomyces roseus*, identificadas nas diferentes salmouras. Na polpa dos frutos, para além da espécie *A. pullulans*, *C. boidinii*, *P. membranifaciens*, e *S. cerevisiae* presentes nas salmouras, surgiram outras espécies como; *C. olivae* e *R. mucilaginosa*.

As espécies mais abundantes nas salmouras e na polpa dos frutos foram: *S. cerevisiae* (308 e 143), *P. membranifaciens* (277 e 130), *C. boidinii* (198 e 98), *A. pullulans* (86 e 53) e *C. aaseri* (73 e 34), respetivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Abundância de espécies de leveduras e LAB isoladas de cinco salmouras diferentes e de azeitonas de mesa Negrinha de Freixo em diferentes estados de maturação (verdes, mistas e pretas) no final do processo fermentativo.

População microbiana		Salmoura de fermentação					Polpa do fruto						
		0% NaCl	3% NaCl	6% NaCl	9% NaCl	12% NaCl	Total	0% NaCl	3% NaCl	6% NaCl	9% NaCl	12% NaCl	Total
Azeitonas Verdes	Leveduras												
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	2	3	13	20	38	1	0	2	10	9	22
	<i>Candida boidinii</i>	17	25	18	4	9	73	6	1	19	1	1	28
	<i>Pichia membranifaciens</i>	19	15	10	14	26	84	2	7	15	5	7	36
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	19	18	16	15	80	9	5	9	12	8	43
	Total	48	61	49	47	70	275	18	13	45	28	25	129
	Bactérias ácido lácticas												
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	2	10	11	26	52	1	2	1	5	9	18
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	1	3	12	11	28	1	1	3	6	10	21
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0	1	2	5	10	18	0	0	0	4	8	12
Total	4	4	15	38	47	98	2	3	4	15	27	51	
Azeitonas Mistas	Leveduras												
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	1	10	12	25	48	0	0	6	11	14	31
	<i>Candida boidinii</i>	2	8	5	8	11	34	8	9	9	7	4	37
	<i>Candida diddensiae</i>	5	31	30	9	8	83	0	0	0	0	0	0
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2	6	7	10	5	30	2	3	1	1	1	8
	<i>Pichia membranifaciens</i>	8	7	6	22	38	81	2	3	5	14	10	34
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9	15	16	29	7	76	3	6	5	10	2	26
	Total	26	68	74	90	94	352	15	21	26	43	31	136
	Bctérias ácido lácticas												
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	5	14	16	21	58	3	5	10	12	19	49
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	1	5	5	10	21	3	6	10	12	13	44	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3	3	4	10	16	36	5	9	8	10	14	46	
Total	5	9	23	31	56	115	11	20	28	34	46	139	

Leveduras													
Azeitonas Pretas	<i>Candida aaseri</i>	12	8	15	17	21	73	3	5	11	8	7	34
	<i>Candida atlantica</i>	2	1	12	13	25	53	3	5	3	17	12	40
	<i>Candida boidinii</i>	8	21	25	22	15	91	6	11	7	8	1	33
	<i>Candida diddensiae</i>	5	29	38	4	2	78	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida olivae</i>	0	0	0	0	0	0	3	10	11	2	1	27
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	3	11	5	3	2	24	5	13	12	2	1	33
	<i>Pichia membranifaciens</i>	10	15	16	33	38	112	8	7	9	15	21	60
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	0	0	0	5	17	15	2	1	40
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	10	32	43	55	152	7	5	16	18	28	74
	<i>Sporobolomyces roseus</i>	18	22	15	5	4	64	13	11	2	1	2	29
Total	70	117	160	138	162	647	53	84	86	73	74	370	
Bactérias ácido lácticas													
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10	12	19	25	45	111	6	6	8	15	16	51
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	4	8	10	15	39	4	9	14	18	21	66
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	8	10	12	16	22	68	5	5	10	21	17	58
	Total	20	26	39	51	82	218	15	20	32	54	54	175

As restantes surgiram em menor abundância, a variar entre 64 e 29 para *S. roseus*; 54 e 41 para *M. guilliermondii*; e 53 e 40 para *C. atlantica*. Entre as leveduras encontradas, três espécies dominaram os diferentes processos fermentativos, tanto ao nível dos frutos como ao nível das salmouras, destacando-se a *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae* e *C. boidinii*. Os resultados sugerem não existir especificidade para determinada condição, ou seja, concentração de sal e tipo de azeitona ou índice de maturação.

Resultados semelhantes foram obtidos em fermentações realizadas por Silva et al. (2011) em azeitonas Galega e Cordovil; Leventdurur et al. (2016) em azeitonas da variedade Gemlik; Bonatsou et al. (2018) em azeitonas pretas Kalamata; e ainda em azeitonas pretas Nyons por Penland et al. (2020).

Estas espécies (Bautista-Gallego et al., 2011) e outras do mesmo género (Heperkan, 2013; Pereira et al., 2015) também foram relatadas como as mais frequentemente isoladas em fermentações de azeitonas de mesa.

As espécies *P. membranifaciens* e *C. boidinii* têm sido descritas por vários autores em fermentações naturais e frequentemente detetadas em salmouras na fase final do processo (Lucena-Padrós et al., 2014; Rodríguez-Gómez et al., 2010). Neste trabalho estas espécies surgiram nas salmouras e na polpa das azeitonas, e à semelhança de estudos anteriores também foram detetadas no final da fermentação.

Nas fermentações de azeitonas de mesa, as leveduras são um grupo de microrganismos fundamental, e dependendo da espécie envolvida podem exercer efeitos positivos ou negativos, sendo de grande importância avaliar a sua biodiversidade. Com efeito positivo, espécies do género *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces* são conhecidas por terem um número considerável de estirpes *killer* (proteínas ou glicoproteínas tóxicas) contra leveduras deteriorantes (Arroyo-López et al., 2012; Hernández et al., 2008).

Candida boidinii foi reconhecida por ter um efeito positivo sobre o aroma da azeitona, por meio da formação de ésteres a partir de ácidos gordos livres (Arroyo-López et al., 2012; Bautista-Gallego et al., 2011).

Pichia membranifaciens é considerada uma levedura de alta tolerância ao sal, que pode influenciar a fermentação afetando associações de leveduras através da produção de toxinas (Arroyo-López et al., 2008). Nativa em azeitonas de variedades portuguesas, apresenta atividade oleuropeinolítica, micogénica e antimicrobiana (Pereira et al., 2015; Silva et al., 2011). Adicionalmente, *S. cerevisiae* e várias espécies do género

apresentaram atividade antioxidante, útil para proteger os frutos da oxidação dos ácidos gordos insaturados e da formação de peróxidos (Hernández et al., 2007).

No presente trabalho, o maior número de espécies identificadas de leveduras foi ao nível das fermentações realizadas com azeitonas pretas (10 espécies), seguindo-se as mistas (6 espécies) e por fim as verdes (4 espécies).

A espécie *A. pullulans* surgiu exclusivamente em fermentações de azeitonas verdes e mistas, enquanto que *C. diddensiae* e *M. guillermondii* surgiram em fermentações de azeitonas mistas e pretas. Por outro lado, *C. aaseri*, *C. atlantica* e *S. roseus* foram encontradas unicamente em salmouras de azeitonas pretas (Tabela 5).

Vários estudos reportam que a flora microbiana é muito heterogénea e que esta altera dependendo da variedade, região, condições de temperatura, concentração de sal e pH, bem como, nutrientes, oxigénio e interações com outros microrganismos (Abriouel et al., 2011; Arroyo-López et al., 2008; Chorianopoulos et al., 2005; Corsetti et al., 2012; Tofalo et al., 2013).

De facto, neste estudo a presença de determinadas leveduras em detrimento de outras poderá estar relacionada com a composição química de cada fruto, resultado dos diferentes índices de maturação. O teor de fenóis diminui durante o amadurecimento, tornando o fruto mais favorável à colonização e crescimento de microrganismos (Gouvinhas et al., 2017).

Recentemente, Martins et al. (2021) reportaram diferenças na estrutura da comunidade fúngica detetada ao longo do amadurecimento dos frutos em duas variedades de oliveira. Determinado conjunto de fungos foi positivamente associados a um estado de maturação, sendo a abundância e a riqueza maior nas azeitonas maduras do que nas verdes.

Aureobasidium pullulans é uma espécie de levedura oxidativa onipresente encontrada na endosfera da oliveira (Nigro et al., 2018). Anteriormente isolada de águas hipersalinas, é definida na literatura como microrganismo de natureza halofílica e halotolerante (Kogej et al., 2005). Foi também identificada na fermentação espontânea de azeitona preta Conservolea (Nisiotou et al., 2010), bem como na salmoura de azeitonas de mesa verdes Aloreña e em azeitona verde rachada durante a fermentação natural (Abriouel et al., 2011; Alves et al., 2012). Recentemente foi identificada na fermentação de azeitonas pretas Kalamata e Nyons durante o processo fermentativo (Bonatsou et al., 2018; Penland et al., 2020).

De realçar que, no presente trabalho, a espécie *C. diddensiae* surgiu exclusivamente em salmouras de azeitonas mistas e pretas e esteve completamente ausente na polpa dos frutos. Esta espécie apresentou maior abundância para concentrações 3% e 6% de NaCl. É caracterizada como uma levedura fortemente fermentativa e bem-adaptada à fase inicial da fermentação, estando associada a descidas de pH (Hurtado et al., 2008).

Meyerozyma guilliermondii (anteriormente designada por *Pichia guilliermondii*) foi detetada em menor quantidade. No entanto esteve presente em todas as concentrações de NaCl.

À semelhança do nosso estudo, espécies de género *Meyerozyma* foram detetadas em sete salmouras com diferentes teores de sal em todas as fases de fermentação de azeitonas Gemlik (Leventdurur et al., 2016) bem como, em azeitona da variedade Maçanilha Algarvia, fermentadas em diferentes combinações de sal (Mateus et al., 2016). Este género foi anteriormente identificado em azeitonas Negrinha de Freixo, porém em azeitonas antes do início da fermentação (Pereira et al., 2015). Esta levedura está associada à produção de compostos voláteis em fermentações (Sangorrín et al., 2008).

Candida olivae e *Rhodotorula mucilaginosa*, surgiram somente na polpa de azeitonas pretas, e com maior abundância em níveis de sal mais baixo (3% e 6%) (Tabela 5). A ocorrência exclusiva destas espécies na matéria prima sugere que não estão envolvidas no processo de fermentativo, contudo, poderiam ter influenciado as condições de fermentação. *Candida olivae* foi referida como uma nova espécie associada à fermentação de azeitona preta estilo grego (Nisiotou et al., 2010a).

Rhodotorula mucilaginosa foi associada à salmoura de azeitonas verdes e azeitonas em mudança de cor (Nisiotou et al., 2010). Espécies do género *Rhodotorula* são uma preocupação considerável na elaboração de azeitonas, por serem conhecidas por causar amolecimento dos frutos devido à excreção de poligalacturonases e formação de uma película nas salmouras (Arroyo-López et al., 2008).

No presente estudo observou-se que para concentrações de sal mais altas (9% e 12%), as espécies *A. pullulans*, *C. atlantica* e *C. aaseri* são mais favorecidas relativamente às espécies *M. guilliermondii* e *S. roseus*, encontradas em maior abundância nas salmouras com concentração mais baixas (3% e 6%). Estas espécies foram também as mais abundantes em fermentações monitorizadas em salmouras de 8 e 10% de NaCl de azeitonas Arbequina e Gemlik (Hurtado et al., 2009; Leventdurur et al., 2016),

destacando-se ainda *A. pullulans* por apresentar capacidade de crescer em concentrações de sal de 17% ou mais (Kogej et al. 2005).

Sporobolomyces roseus apresenta um pigmento carotenóide que lhe confere a coloração alaranjada/salmão. A sua presença foi descrita em azeitonas mistas por Nogueira (2012), e mais recentemente identificada em amostras de azeite da variedade Cellina di Nardò (Pizzolante et al., 2018).

Fermentações de azeitona preta com níveis elevados de sal (10%) permitiu o domínio de leveduras e, ocasionalmente BAL, que resultaram em valores de pH mais altos e com menor capacidade de preservação (Nisiotou et al., 2010; Tassou et al., 2002). De facto, a concentração inicial de NaCl nas salmouras afeta o nível de sódio na polpa das azeitonas, uma vez que a entrada de sal é realizada por difusão até atingir um equilíbrio.

Relativamente às BAL, os resultados do PCR e análise da sequenciação de um número representativo de isolados, revelaram três espécies diferentes pertencentes a dois géneros bacterianos: *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. A abundância de cada espécie nas diferentes fermentações está representada na Tabela 5.

No presente trabalho três espécies estiveram envolvidas no processo: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Entre as espécies identificadas *L. plantarum* foi a mais frequentemente isolada, com abundâncias a variar entre 231 e 118 nas salmouras e nos frutos, seguido de *L. mesenteroides* (86 e 125) e *L. pseudomesenteroides* (78-42).

Estes resultados estão de acordo com o descrito por Oliveira et al. (2004). Similarmente, Idoui et al. (2009) referem que a microflora de azeitonas pretas tradicionalmente fermentadas no leste da Argélia é representada essencialmente por *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Recentemente, estas espécies foram identificadas em azeitonas verdes (cv. Geracese e Nocellara Etnea) (Randazzo et al., 2012), e em azeitonas de mesa (cv. Cobrançosa) resultantes da fermentação natural (Reis et al., 2022).

Neste estudo verificou-se maior abundância bacteriana ao nível das salmouras (abundância total igual a 431) comparativamente com a polpa dos frutos (abundância total igual 365). A fermentação realizada com azeitonas pretas foi aquela que apresentou maior abundância (218 e 175), seguindo-se a fermentação de azeitonas mistas (115 e 139) e, por fim, a fermentação de azeitonas verdes (98 e 51), ao nível da salmoura e respetivos frutos.

Os resultados obtidos mostram que estas espécies estão presentes em todas as salmouras, bem como nas respectivas azeitonas. Porém, *L. plantarum* e *L. pseudomesenteroides* apresentaram maior abundância em fermentações de azeitonas mistas (58 e 49; 36 e 46) e pretas (111 e 51; 68 e 58), contrariamente a *L. mesenteroides* (21 e 44; 39 e 66). Das diferentes salmouras estudadas, as que apresentaram maior abundância de BAL foram as realizadas com 6, 9 e 12% de NaCl. Por outro lado, baixas concentrações de sal (0 e 3%) apresentaram pequeno impacto sobre a composição das comunidades microbianas, resultando em reduzida abundância bacteriana (Tabela 5).

Estes resultados indicam maior adaptação e afinidade dos microrganismos para determinada condição de salmoura (6, 9, 12 %) e de azeitonas com índice de maturação mais avançado (azeitonas pretas).

Vários estudos referem que o índice de maturação de azeitona de mesa influencia tanto a microbiota, quanto as características sensoriais finais da mesma (Hurtado et al., 2009).

LAB são conhecidas por melhorar a preservação das fermentações, pois conferem acidificação à salmoura, além de produzirem bacteriocinas que previnem o crescimento de microrganismos contaminantes. Algumas estirpes também auxiliam na remoção do amargor via hidrólise de oleuropeína, melhorando assim o sabor final (Anagnostopoulos et al., 2020).

4.2.3 Avaliação da presença de agentes patogénicos no final da fermentação

No presente estudo, a avaliação da qualidade microbiológica das salmouras e das azeitonas de mesa, não evidenciaram nenhum caso de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (coliformes e *Escherichia coli*), nem de bactérias patogénicas, *Clostridium perfringens*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. Assim, as azeitonas de mesa revelaram excelente qualidade microbiológica.



5. Conclusões

5. Conclusões

Em termos gerais, observaram-se diferenças significativas ao nível da textura entre os índices de maturação, tendo as azeitonas verdes apresentado os maiores valores de mediana para a dureza e mastigabilidade, e menores para a adesividade, elasticidade e coesividade. Relativamente à concentração de sal, esta não afetou de forma evidente a textura das azeitonas, tendo em conta os parâmetros avaliados (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade).

O pH da salmoura aumentou ao longo da fermentação, tendo as concentrações mais elevadas de sal (9 e 12%) apresentado a menor subida. A salmoura de azeitonas pretas foi a que apresentou os valores de pH mais baixos durante o processo fermentativo e em todas as concentrações de sal testadas, apontando para o papel significativo dos fenóis presentes no fruto. Observou-se um comportamento semelhante nos valores de pH do fruto face à salmoura. Contudo, detetou-se uma diminuição do pH entre os 30 e 90 dias de fermentação. O valor de pH na polpa foi pouco influenciado pela concentração de sal e o estado de maturação dos frutos. Observou-se um aumento na acidez titulável nas salmouras com 6%, 9% e 12% de NaCl dos 30 aos 90 dias, sendo mais acentuado nas azeitonas verdes, tendo a acidez titulável diminuído posteriormente até aos 210 dias. Comportamento semelhante foi obtido para o fruto. Estes resultados demonstram a importância dos produtores fazerem a monitorização e correção do pH, através da adição de suplementos de glucose e sacarose, substâncias reguladoras de acidez ou da inoculação com culturas BAL e leveduras.

Relativamente ao crescimento microbiano, observaram-se comportamentos distintos no crescimento dos microrganismos ao longo da fermentação. Contudo, no final da fermentação (210 dias), a percentagem de sal e o índice de maturação não afetaram de forma muito significativa a flora presente na polpa do fruto, tendo sido os bolores os que apresentaram menores contagens. As espécies mais abundantes nas salmouras e na polpa dos frutos foram *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *C. boidinii*, *A. pullulans* e *C. assseri*. Para as concentrações de sal mais elevadas (9% e 12%), as espécies *A. pullulans*, *Candida atlantica* e *Candida aaseri* foram mais favorecidas relativamente às espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Sporobolomyces roseus*. Relativamente às BAL, três espécies foram identificadas, designadamente, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. De entre as salmouras estudadas, as que apresentaram maior abundância de BAL foram as de 6%, 9% e 12% em NaCl, indicando a importância

da concentração de sal como factor que influencia a microbiota presente nas azeitonas. De entre os patogénicos analisados, os mesmos não foram detetados no final da fermentação.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., & Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006>.
- Alves, M., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, *23*(2), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.033>.
- Anagnostopoulos, D. A., Kamilari, E., & Tsaltas, D. (2020). Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01128>.
- Antunes, R. C. (2019b). *Desenvolvimento de farinhas a partir de azeitona de conserva cv. Negrinha de Freixo*. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, p. 61.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018>.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, *160*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003>.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, *147*(2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013>.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *105*(5), 229–242. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390046>.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F. A., Grieco, F., Cappello, M. S., De Domenico, S., Mita, G., Tasioula-Margari, M., & Logrieco, A. F. (2014). Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation

- of Cellina di Nardò and Leccino table olives. *Frontiers in Microbiology*, 5(570), 18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00570>.
- Bonatsou, S., Paramithiotis, S., & Panagou, E. Z. (2018). Evolution of Yeast Consortia during the Fermentation of Kalamata Natural Black Olives upon Two Initial Acidification Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 8(2673). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02673>.
- Borges, A. M. R. (2013). *Evolução da população microbiana ao longo do processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo*. Tese de Mestrado. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, p. 88.
- BS ISO 15214:1998- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C.
- Campus, M., Değirmencioglu, N., & Comunian, R. (2018). Technologies and Trends to Improve Table Olive Quality and Safety. *Frontiers in Microbiology*, 9(617), 23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00617>.
- Cardoso, S. M., Ferreira, J. A., Mafra, I., Silva, A. M. S., & Coimbra, M. A. (2007). Structural Ripening-Related Changes of the Arabinan-Rich Pectic Polysaccharides from Olive Pulp Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7124–7130. <https://doi.org/10.1021/jf070769w>.
- Chen, L., & Opara, U. L. (2013). Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods – A review. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.028>.
- Chorianopoulos, N. G., Boziaris, I. S., Stamatiou, A., & Nychas, G.-J. E. (2005). Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, 22(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.04.010>.
- Codex Alimentarius. (2013). *STANDARD FOR TABLE OLIVES (Revision of Codex Stan 66-1981)*.
- COI. (2004). *Trade Standard Applying to Table Olives (Resolution No. RES-2/91-IV/04)*. 19. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Acedido a 25 de Dezembro de 2021.

- COI. (2021). *Economic Affairs & Promotion Unit*. International Olive Council. <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>. Acedido em 01 de Dezembro 2021.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: An overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, 3(248), 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00248>.
- DGADR. (2022). *Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo DOP*. Produtos Tradicionais Portugueses. <https://tradicional.dgadr.gov.pt>. Acedido a 10/01/2022.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>.
- EAmbrosia. (2022). <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>. Acedido a 10/02/2022.
- Fadda, C., Caro, A. D., Sanguinetti, A. M., & Piga, A. (2014). Texture and antioxidant evolution of naturally green table olives as affected by different sodium chloride brine concentrations. *Grasas y Aceites*, 65(1), e002. <https://doi.org/10.3989/gya.037213>.
- FAOSTAT. (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#country>. Acedido a 15/01/2022.
- Ferreira, A. C. E. (2015). *Caracterização da Cadeia de Valor da Azeitona de Mesa*. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa, Lisboa, p. 102.
- Gandul-Rojas, B., & Gallardo-Guerrero, L. (2020). Characterization and Processing of Table Olives: A Special Issue. *Foods*, 9(10), 1469. <https://doi.org/10.3390/foods9101469>.
- Gómez, A. H. S., García, P. G., & Navarro, L. R. (2006). Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57(1), 86–94. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.24>.
- Gouvinhas, I., Domínguez-Perles, R., Gironés-Vilaplana, A., Carvalho, T., Machado, N., & Barros, A. (2017). Kinetics of the Polyphenolic Content and Radical Scavenging Capacity in Olives through On-Tree Ripening. *Journal of Chemistry*, 2017, e5197613. <https://doi.org/10.1155/2017/5197613>.
- Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00143>.

- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevaldo, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.022>.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., & Pérez-Nevaldo, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044>.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2009). Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiology*, 26(8), 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.010>.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., & Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, 41(7), 738–744. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.05.007>.
- Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchi, E., & Karam, N.-E. (2009). Naturally fermented Jijelian black olives: Microbiological characteristics and isolation of lactic acid bacteria. *Grasas y Aceites*, 60(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3989/gya.043009>
- INE- Instituto Nacional de Estatística (2022). *Estatísticas de Produção vegetal*. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000019&contexto=bd&selTab=tab2. Acedido a 25/01/2022.
- IPQ. (2012). Norma Portuguesa (NP) 3034-2012: Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- ISO 4833-1:2013-Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.
- ISO 6579:2002- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 6887-6:2013- Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.
- ISO 7937:2004- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique.

- ISO 11290-1:2017- Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method.
- ISO 21527-1:2008- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- ISO 21528-2:2004- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count method.
- Kiai, H., Raiti, J., El Abbassi, A., & Hafidi, A. (2020). Chemical Profiles of Moroccan Picholine Olives and Its Brines during Spontaneous Fermentation. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup3), 1297–1312. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1785986>.
- Koc, C. C., Rospigliosi, W. G., Arata, M. G., Sepúlveda, P. L., & Ochoa, C. V. (2013). Aeration and Sodium chloride in the develop of microflora and phycochemical parameters on the *Olea europaea* L. cv Sevillana fermentation at the natural black style in La Yarada zone-Tacna. *Grasas y Aceites*, 64(3), 320–327. <https://doi.org/10.3989/gya.131212>.
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6600–6605. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6600-6605.2005>.
- Lane, D. J. (1991). In: Stackebrandt, E. e Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. *John Wiley & Sons, New York.*, 115–175.
- Lanza, B., & Amoruso, F. (2018). Measurement of kinaesthetic properties of in-brine table olives by microstructure of fracture surface, sensory evaluation and texture profile analysis (TPA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4142–4150. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8932>.
- Lanza, B., Di Marco, S., Bacceli, M., Di Serio, M. G., Di Loreto, G., Cellini, M., & Simone, N. (2021). Lactiplantibacillus plantarum Used as Single, Multiple, and Mixed Starter Combined with Candida boidinii for Table Olive Fermentations: Chemical, Textural, and Sensorial Characterization of Final Products. *Fermentation*, 7(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040239>.

- Lanza, B., Di Marco, S., Simone, N., Di Marco, C., & Gabriele, F. (2020). Table Olives Fermented in Iodized Sea Salt Brines: Nutraceutical/Sensory Properties and Microbial Biodiversity. *Foods*, 9(3), 301. <https://doi.org/10.3390/foods9030301>.
- Leitão, F., Potes, M. de F., Calado, M. L., & Almeida, F. J. (1986). *Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção-Geral de Planeamento e Agricultura, Lisboa. 117.
- Leventdurur, S., Sert-Aydin, S., Boyaci-Gunduz, C. P., Agirman, B., Ben Ghorbal, A., Francesca, N., Martorana, A., & Erten, H. (2016). Yeast biota of naturally fermented black olives in different brines made from cv. Gemlik grown in various districts of the Cukurova region of Turkey. *Yeast (Chichester, England)*, 33(7), 289–301. <https://doi.org/10.1002/yea.3170>.
- Lucena-Adrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2014). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiology*, 42, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.020>.
- Malheiro, R., Casal, S., Sousa, A., de Pinho, P. G., Peres, A. M., Dias, L. G., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). Effect of Cultivar on Sensory Characteristics, Chemical Composition, and Nutritional Value of Stoned Green Table Olives. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1733–1742. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0567-x>.
- Malheiro, R., Mendes, P., Fernandes, F., Rodrigues, N., Bento, A., & Pereira, J. A. (2014). Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food & Function*, 5(12), 3132–3142. <https://doi.org/10.1039/C4FO00560K>.
- Martins, F., Cameirão, C., Mina, D., Benhadi-Marín, J., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2021). Endophytic fungal community succession in reproductive organs of two olive tree cultivars with contrasting anthracnose susceptibilities. *Fungal Ecology*, 49, 101003. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101003>.
- Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., & Quintas, C. (2016). The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.008>.
- Ministério da Agricultura. (s/d). *Anexo I - Principais Características da «Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo»*.

- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>.
- Nigro, F., Antelmi, I., Labarile, R., Sion, V., & Pentimone, I. (2018). Biological control of olive anthracnose. *Acta Horticulturae, No.1199*, 439–444.
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. e., & Panagou, E. z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 396–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x>.
- Nisiotou, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2010a). *Candida olivae* sp. nov., a novel yeast species from «Greek-style» black olive fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 5), 1219–1223. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.012955-0>.
- Nogueira, F. A. M. (2012). *Contribuição para a caracterização de “azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: Aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos*. Tese de Mestrado, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, p. 98.
- Norma Portuguesa (NP) 3034 (2012). Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Norma Portuguesa (NP) 1421(1997). Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., & Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of ‘Galega’ Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55(3), 219–226. <https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i3.169>.
- Paba, A., Chessa, L., Daga, E., Campus, M., Bulla, M., Angioni, A., Sedda, P., & Comunian, R. (2020). Do Best-Selected Strains Perform Table Olive Fermentation Better than Undefined Biodiverse Starters? A Comparative Study. *Foods*, 9(2), 135. <https://doi.org/10.3390/foods9020135>.
- Panagou, E. Z., Hondrodinou, O., Mallouchos, A., & Nychas, G.-J. E. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology*, 28(7), 1301–1307. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.008>.

- Penland, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur, C., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., & Cotton, M. (2020). Deciphering Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black Olive Natural Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, *11*(586614), 18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586614>.
- Pereira, E. L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2015). YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiology*, *46*, 582–586. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.003>.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Use of *Lactobacillus plantarum* and Glucose to Control the Fermentation of “Bella di Cerignola” Table Olives, a Traditional Variety of Apulian Region (Southern Italy). *Journal of Food Science*, *75*(7), 430–436. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01742.x>.
- Pires-Cabral, P., Barros, T., Nunes, P., & Quintas, C. (2018). Physicochemical, nutritional and microbiological characteristics of traditional table olives from Southern Portugal. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *30*(7), 611–620. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i7.1747>.
- Pizzolante, G., Durante, M., Rizzo, D., Di Salvo, M., Tredici, S. M., Tufariello, M., De Paolis, A., Talà, A., Mita, G., Alifano, P., & De Benedetto, G. E. (2018). Characterization of two *Pantoea* strains isolated from extra-virgin olive oil. *AMB Express*, *8*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0642-z>.
- Poiana, M., & Romeo, F. (2006). Changes in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas y Aceites*, *57*(4), 402–408. <https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i4.66>.
- Prata, J. J. (2015). *Contribuição para o estudo da produção de azeitona de mesa da cultivar Cobrançosa: Caracterização físico-química, organoléptica e nutricional*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve, Faro, p. 105.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., & Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal*

- of Food Microbiology*, 90(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00159-4).
- Randazzo, C. L., Ribbera, A., Pitino, I., Romeo, F. V., & Caggia, C. (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 32(1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.013>.
- Reis, P. J. M., Tavares, T. G., Rocha, J. M., Malcata, F. X., & Macedo, A. C. (2022). Cobrançosa Table Olives: Characterization of Processing Method and Lactic Acid Bacteria Profile throughout Spontaneous Fermentation. *Applied Sciences*, 12(19), Art. 19. <https://doi.org/10.3390/app12199738>.
- Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: A review. *Journal of Nutritional Science*, 9(57), 16. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>.
- Rodrigues, N. M. da S. F. (2011). *Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve*. Tese de Mestrado. Universidade do Algarve. Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve, Faro, p. 95.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27(5), 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.003>.
- Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Jofré, V., Querol, A., & Caballero, A. C. (2008). Spoilage yeasts from Patagonian cellars: Characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 945–953. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9557-6>.
- Saúde, C. E. V. C. da. (2014). *Azeitona de mesa natural da cultivar Maçanilha com baixo teor de cloreto de sódio*. Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia, Universidade do Algarve. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/8109>.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT - Food Science and Technology*, 6(44), 1349–1354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.029>.
- Sousa, A. da C. de. (2015). *Determinação do ponto ótimo de colheita das cultivares de oliveira pertencentes à denominação de origem protegida «Azeite de Trás-os-Montes»* Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, p. 164.

- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, *19*, 605–615. <https://doi.org/10.1006/yfmic.480>.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.011>.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: M. Innis, D., Gelfand, J., Shinsky, & White, T.J (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, USA, Academic Press. 315–322.
- Yarrow, D. (1998). Chapter 11—Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Em C. P. Kurtzman & J. W. Fell (Eds.), *The Yeasts (Fourth Edition)* (pp. 77–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50014-9>.

Anexos

ANEXOS

Tabela A1. Parâmetros da textura (Média ± Desvio padrão).

Parâmetro	Azeitona	Sal (%)	Tempo (dias)		
			30	90	210
Dureza	Verde	0	7828±2708 ^{b,B,C}	7750±2373 ^{b,A}	5706±3540 ^{a,A}
		3	8684±2863 ^{b,C}	8350±2744 ^{b,A}	6546±3164 ^{a,A}
		6	3528±1392 ^{a,A}	7508±2002 ^{b,A}	6936±3218 ^{b,A}
		9	5956±3978 ^{a,A,B}	7936±4014 ^{a,A}	7920±2728 ^{a,A}
		12	6909±5572 ^{a,b,B,C}	7938±3192 ^{c,A}	6952±2449 ^{b,c,A}
	Mista	0	4809±1667 ^{b,A,B}	3494±1523 ^{a,A}	4104±1393 ^{a,b,A}
		3	4456±1357 ^{a,A}	4985±1770 ^{a,B,C}	4034±1518 ^{a,A}
		6	4323±1419 ^{a,A}	4015±1310 ^{a,A,B}	4419±1260 ^{a,A}
		9	5614±1577 ^{b,B}	4657±1315 ^{a,B,C}	4341±1231 ^{a,A}
		12	5054±1506 ^{a,A,B}	5335±1751 ^{a,C}	4816±1232 ^{a,A}
	Preta	0	2698±856 ^{a,A,B}	7935±2481 ^{c,A}	5713±3600 ^{b,A}
		3	2601±820 ^{a,A}	8097±2754 ^{c,A}	6546±3164 ^{b,A,B}
		6	2726±540 ^{a,A,B}	7508±2001 ^{b,A}	6936±3217 ^{b,A,B}
		9	3089±1410 ^{a,A,B}	8169±3873 ^{b,A}	7919±2728 ^{b,B}
		12	3402±1113 ^{a,B}	7938±3192 ^{b,A}	6952±2449 ^{b,A,B}
Adesividade	Verde	0	-5±5 ^{b,A}	-4±5 ^{b,A}	-10±8 ^{a,A}
		3	-6±7 ^{b,A}	-7±7 ^{b,A}	-13±7 ^{a,A}
		6	-4±7 ^{a,A}	-7±7 ^{a,A}	-8±7 ^{a,A}
		9	-7±7 ^{b,A}	-7±6 ^{b,A}	-12±7 ^{a,A}
		12	-7±7 ^{a,b,A}	6±6 ^{b,A}	-11±7 ^{a,A}
	Mista	0	-4±6 ^{a,A}	-2±4 ^{a,A,B}	-3±5 ^{a,A}
		3	-8±8 ^{a,A}	-1±2 ^{b,A,B}	-7±7 ^{a,A}
		6	-5±7 ^{a,A}	-1±1 ^{b,B}	-4±5 ^{a,A}
		9	-6±7 ^{a,A}	-2±3 ^{b,A,B}	-5±7 ^{a,b,A}
		12	-4±5 ^{a,A}	-3±5 ^{a,A}	-5±7 ^{a,A}
	Preta	0	-1±4 ^{b,A}	-4±5 ^{b,A}	-10±8 ^{a,A}
		3	-3±6 ^{c,A}	-8±7 ^{b,A}	-13±7 ^{a,A}
		6	-1±0 ^{b,A}	-7±7 ^{a,A}	-8±7 ^{a,A}
		9	-1±1 ^{c,A}	-7±6 ^{b,A}	-12±7 ^{a,A}
		12	-1±2 ^{c,A}	-6±6 ^{b,A}	-11±7 ^{a,A}
Elasticidade	Verde	0	0,60±0,08 ^{a,b,A}	0,63±0,09 ^{b,A}	0,55±0,10 ^{a,A}
		3	0,61±0,06 ^{a,A}	0,61±0,07 ^{a,A}	0,57±0,09 ^{a,A,B}
		6	0,75±0,06 ^{b,B}	0,63±0,04 ^{a,A}	0,63±0,09 ^{a,B}
		9	0,65±0,15 ^{a,A}	0,62±0,09 ^{a,A}	0,61±0,07 ^{a,B}
		12	0,63±0,15 ^{a,A}	0,63±0,09 ^{a,A}	0,60±0,07 ^{a,A,B}
	Mista	0	0,69±0,09 ^{a,A}	0,68±0,09 ^{a,A}	0,65±0,08 ^{a,A}
		3	0,69±0,06 ^{a,A}	0,70±0,09 ^{a,A}	0,67±0,07 ^{a,A,B}
		6	0,68±0,12 ^{a,A}	0,70±0,07 ^{a,A}	0,68±0,08 ^{a,A,B}
		9	0,68±0,07 ^{a,A}	0,69±0,06 ^{a,A}	0,71±0,08 ^{a,B}
		12	0,72±0,07 ^{a,A}	0,68±0,07 ^{a,A}	0,69±0,07 ^{a,A,B}
	Preta	0	0,74±0,12 ^{b,A}	0,62±0,10 ^{a,A}	0,55±0,10 ^{a,A}
		3	0,74±0,11 ^{b,A}	0,61±0,07 ^{a,A}	0,57±0,09 ^{a,A,B}
		6	0,76±0,05 ^{b,A}	0,63±0,04 ^{a,A}	0,63±0,09 ^{a,B}
		9	0,73±0,11 ^{b,A}	0,63±0,08 ^{a,A}	0,61±0,07 ^{a,A,B}
		12	0,74±0,07 ^{b,A}	0,63±0,09 ^{a,A}	0,60±0,07 ^{a,A,B}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento para uma dada concentração de sal fixa ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as concentrações de sal para um dado tempo de armazenamento ($p < 0,05$).

Tabela A1. Parâmetros da textura (Média ± Desvio padrão) (cont.)

Parâmetro	Azeitona	Sal (%)	Tempo (dias)		
			30	90	210
Coesividade	Verde	0	0,31±0,07 ^{a,A}	0,35±0,06 ^{a,A}	0,34±0,06 ^{a,A}
		3	0,36±0,07 ^{a,A,B}	0,36±0,05 ^{a,A}	0,36±0,06 ^{a,A,B}
		6	0,43±0,04 ^{c,C}	0,35±0,06 ^{a,A}	0,39±0,07 ^{b,B}
		9	0,41±0,10 ^{a,B,C}	0,37±0,06 ^{a,A}	0,37±0,06 ^{a,A,B}
		12	0,40±0,11 ^{a,B,C}	0,37±0,08 ^{a,A}	0,35±0,06 ^{a,A,B}
	Mista	0	0,40±0,07 ^{a,A}	0,37±0,07 ^{a,A}	0,37±0,05 ^{a,A}
		3	0,38±0,06 ^{a,A}	0,44±0,11 ^{b,B}	0,37±0,05 ^{a,A}
		6	0,40±0,09 ^{a,A}	0,40±0,06 ^{a,A,B}	0,40±0,08 ^{a,A}
		9	0,39±0,06 ^{a,A}	0,38±0,06 ^{a,A,B}	0,40±0,06 ^{a,A}
		12	0,41±0,06 ^{a,A}	0,40±0,08 ^{a,A,B}	0,39±0,07 ^{a,A}
	Preta	0	0,44±0,09 ^{b,A}	0,34±0,06 ^{a,A}	0,34±0,06 ^{a,A}
		3	0,43±0,10 ^{b,A}	0,36±0,05 ^{a,A}	0,36±0,06 ^{a,A,B}
6		0,43±0,04 ^{b,A}	0,35±0,06 ^{a,A}	0,39±0,07 ^{b,B}	
9		0,46±0,11 ^{b,A}	0,36±0,05 ^{a,A}	0,37±0,06 ^{a,A,B}	
12		0,41±0,05 ^{b,A}	0,37±0,08 ^{a,b,A}	0,35±0,06 ^{a,A,B}	
Mastigabilidade	Verde	0	1443±541 ^{b,A}	1654±567 ^{b,A}	1037±683 ^{a,A}
		3	1912±768 ^{b,B}	1823±574 ^{b,A}	1350±736 ^{a,A,B}
		6	1095±330 ^{a,A}	1618±399 ^{b,A}	1645±664 ^{b,B}
		9	1348±576 ^{a,A}	1769±842 ^{b,A}	1726±490 ^{a,b,B}
		12	1501±843 ^{a,A,B}	1778±666 ^{a,A}	1479±541 ^{a,A,B}
	Mista	0	1294±464 ^{b,A,B}	923±308 ^{a,A}	979±325 ^{a,A}
		3	1143±355 ^{a,A}	1488±663 ^{b,B}	979±333 ^{a,A}
		6	1163±468 ^{a,A,B}	1101±316 ^{a,A}	1177±339 ^{a,A,B}
		9	1480±416 ^{b,B}	1191±331 ^{a,A,B}	1215±336 ^{a,A,B}
		12	1463±430 ^{a,B}	1452±569 ^{a,B}	1258±356 ^{a,B}
	Preta	0	859±261 ^{a,A}	1667±580 ^{b,A}	1051±690 ^{a,A}
		3	810±247 ^{a,A}	1746±576 ^{c,A}	1350±736 ^{b,A,B}
		6	889±209 ^{a,A}	1618±399 ^{b,A}	1645±664 ^{b,B}
		9	1002±435 ^{a,A}	1821±805 ^{b,A}	1726±490 ^{b,B}
		12	996±243 ^{a,A}	1778±666 ^{b,A}	1479±541 ^{b,A,B}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento para uma dada concentração de sal fixa ($p < 0,05$). Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as concentrações de sal para um dado tempo de armazenamento ($p < 0,05$).