

Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos

Filipa Alexandra Marçal Nogueira

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

Orientado por

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Prof. Doutora Susana Isabel Pereira Casal Vicente

**Bragança
2012**

Trabalho realizado no âmbito do Projeto:

AGRIINDIF "*Mejora de la competitividad del sector agrario de Castilla y León y Norte de Portugal a través de la innovación y el desarrollo de productos diferenciados de alto valor*" financiado no âmbito do POCTEP - Programa Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal 2007-2013

Aos meus pais e irmã

Ao Ricardo

Agradecimentos

É com grande satisfação que agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária, pelo imenso auxílio prestado na realização do trabalho laboratorial e escrito, pelo constante incentivo e disponibilidade, pela paciência e conselhos fornecidos.

À Professora Doutora Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade e ensinamentos prestados na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ermelinda Pereira, da Escola Superior Agrária, pelos conhecimentos transmitidos na parte da caracterização microbiológica, pela sua constante disponibilidade e apoio.

Ao Ricardo Malheiro por todos os ensinamentos e ajuda prestados na execução prática e escrita deste trabalho, pela paciência, incentivo e boa disposição.

À Anabela e ao Ivo pelos conselhos e ajuda prestados na realização deste trabalho.

Ao Nuno, pela sua incansável ajuda, pelo seu apoio, boa disposição e amizade.

Às minhas amigas, Patrícia e Vanessa, pela enorme amizade e carinho, pelos conselhos, companhia e por todos os momentos de alegria e diversão que permitiram completar todo este trabalho.

Ao Ricardo, pelo companheirismo e dedicação, pela força fornecida em todos os momentos, pelo constante interesse, auxílio e conselhos transmitidos, e sobretudo, pelo seu amor e carinho ao longo destes anos.

Por fim, mas nunca em último, agradeço à minha família. Aos meus pais pelo esforço realizado que permitiu que eu chegasse aqui, pelo seu constante apoio, incentivo e pelo seu amor. À minha irmã por me animar em todos os momentos. Aos meus avós que sempre me apoiaram.

ÍNDICE

Resumo	x
Abstract	xi
Capítulo 1: Introdução e objetivos	1
Capítulo 2: Caracterização das Azeitonas de Mesa.....	6
2.1. Definição de “Azeitonas de Mesa”	8
2.2. Anatomia geral do fruto da Oliveira - <i>Azeitona</i>	8
2.3. Classificação das Azeitonas	9
2.4. Métodos de Preparação	12
<i>Azeitonas de Fermentação Natural</i>	12
<i>Azeitonas verdes (Estilo Espanhol ou Sevilhano)</i>	14
<i>Azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano ou Americano)</i>	16
Outros tipos de preparações.....	17
2.5. Composição Química	18
2.6. Proteções Institucionais de Azeitonas de Mesa em Portugal	20
Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo	20
Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior.....	21
2.7. Proteções Institucionais de Azeitonas de Mesa na Europa	23
Capítulo 3: Material e Métodos	25
3.1. Caracterização das Amostras	27
3.2. Parâmetros morfológicos	29
3.2.1. Parâmetros Biométricos	29
3.2.2. Relação polpa/caroço	31
3.3. Parâmetros físico-químicos.....	31
3.3.1. Humidade	31
3.3.2. Cinzas	31
3.3.3. Proteínas	31
3.3.4. Gordura.....	32
3.3.5. Hidratos de Carbono.....	32
3.3.6. Valor Energético	32
3.3.7. Composição em Ácidos Gordos	33
3.3.8. Composição em Tocoferóis.....	33
3.4. Análise estatística	34
3.5. Parâmetros microbiológicos	35
3.5.1. Preparação de amostras	35

3.5.2. Microrganismos pesquisados e/ou quantificados	35
3.5.2.1. Contagem total de microrganismos	35
3.5.2.2. Leveduras	35
3.5.2.3. Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	36
3.5.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.5.2.5. <i>Salmonella</i> spp.....	36
3.5.2.6. Esporos de Clostrídios sulfito-redutores	37
3.5.3. Identificação de Leveduras.....	37
3.5.4. Avaliação qualitativa da atividade enzimática de leveduras	37
3.5.4.1. Catalase.....	38
3.5.4.2. Protease.....	38
3.5.4.3. β -Glucosidase	38
3.5.4.4. Amilase.....	38
3.5.4.5. Esterase.....	39
3.5.4.6. Lipase	39
Capítulo 4: Resultados e Discussão	41
4.1. Parâmetros morfológicos	42
4.1.1. Parâmetros biométricos nos frutos	42
4.1.2. Parâmetros biométricos nos endocarpos.....	48
4.1.3. Relação polpa/caroço.....	53
4.2. Parâmetros físico-químicos.....	55
4.2.1. Composição química	55
4.2.2. Composição em Ácidos Gordos	58
4.2.3. Composição em Tocoferóis	61
4.3. Análise estatística	63
4.3.1. Análise de componentes principais (ACP) – Parâmetros biométricos	63
4.3.2. Análise de componentes principais (ACP) – Composição Química	65
4.4. Parâmetros microbiológicos	68
4.4.1. Segurança microbiológica	68
4.4.2. Identificação de leveduras e atividade enzimática	71
Capítulo 5: Conclusão	75
5. Conclusão.....	77
Referências Bibliográficas	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Algumas cultivares de azeitona existentes em Portugal e respetivas aptidões.	4
Tabela 2. Caracterização das amostras em estudo.....	28
Tabela 3. Parâmetros biométricos avaliados no fruto e no endocarpo.	30
Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de parâmetros biométricos avaliados no fruto.	44
Tabela 5. Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo.....	45
Tabela 6. Defeitos encontrados nos frutos das amostras em estudo e sua caracterização..	47
Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de parâmetros biométricos avaliados no endocarpo.....	49
Tabela 8. Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo.	51
Tabela 9. Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo (continuação da tabela 8).	52
Tabela 10. Valores médios e desvio padrão, em gramas, do fruto, endocarpo, polpa e relação polpa/caroço das amostras em estudo.	54
Tabela 11. Composição química aproximada das amostras em estudo, valores médios e desvio padrão, em percentagem (%).	56
Tabela 12. Composição em ácidos gordos, média e desvio padrão, em percentagem (%), das amostras em estudo.	59
Tabela 13. Valores médios e desvio padrão da composição em ácidos gordos saturados, monoinsaturados, polinsaturados e isómeros <i>trans</i> , em percentagem (%), das amostras em estudo.....	60
Tabela 14. Composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/ 100g de polpa de azeitona) das amostras em estudo (média ± desvio padrão).....	62
Tabela 15. Contagens de microrganismos em amostras de polpa de azeitona (UFC/g)....	69
Tabela 16. Contagens de microrganismos em amostras de salmoura (UFC/ml).....	70
Tabela 17. Isolados de leveduras provenientes da polpa de azeitona e salmoura, identificados por sequenciação parcial do gene rDNA 26S e galerias API 20C AUX.	71
Tabela 18. Atividade enzimática das leveduras identificadas.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de uma azeitona, expondo os seus diferentes constituintes.	8
Figura 2. Síntese dos três principais métodos de processamento de Azeitonas de Mesa...	17
Figura 3. Exemplo de Logotipo de denominação de origem protegida (DOP) e das azeitonas de conserva de Elvas e Campo Maior.....	23
Figura 4. Exemplo de azeitonas pretas, mistas e verdes, provenientes de algumas das amostras em estudo.....	28
Figura 5. Exemplo de amostra de frutos e respetivos endocarpos onde foram avaliados os parâmetros biométricos (amostra 19) e exemplo de medição de um fruto com a craveira.	29
Figura 6. Avaliação dos parâmetros biométricos nos frutos de algumas das amostras em estudo.....	43
Figura 7. Avaliação dos parâmetros biométricos nos endocarpos de algumas das amostras em estudo.....	50
Figura 8. Exemplo de cinzas obtidas da Amostra 10 e 8.....	56
Figura 9. Composição química média das azeitonas de mesa em estudo (%).	57
Figura 10. Composição média em tocoferóis (mg/100g de polpa de azeitona) das amostras em estudo.....	63
Figura 11. ACP usando as variáveis biométricas (peso, comprimento, $D_{máx}$, D_{min} , e forma) de frutos e endocarpos de 21 amostras de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 83.07% da variância total dos dados.....	64
Figura 12. ACP usando a composição em ácidos gordos (individuais e respetivas classes), composição química e composição em tocoferóis de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 57.56% da variância total dos dados.....	66
Figura 13. ACP usando a composição em ácidos gordos (individuais e grupos) de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 70,40% da variância total dos dados.....	67
Figura 14. Espécies de leveduras identificadas por sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rDNA.....	73

Resumo

As azeitonas de mesa são um produto fermentado obtido a partir dos frutos da oliveira, *Olea europaea* L., sendo parte integrante da dieta da região mediterrânea. Trás-os-Montes é reconhecidamente uma das mais importantes regiões produtoras em Portugal, pretendendo-se com este trabalho contribuir para a caracterização das azeitonas de mesa produzidas de forma artesanal na região, como um primeiro impulsionador para a criação de uma nova Denominação de Origem Protegida (DOP). Para o efeito procedeu-se a uma caracterização morfológica e físico-química em 21 amostras e microbiológica em 8 amostras provenientes da região, maioritariamente das cultivares Cobrançosa e Negrinha do Freixo, todas elas processadas segundo o método de fermentação natural e de forma tradicional.

Na caracterização morfológica o comprimento dos frutos variou entre 20,00 mm e 24,93 mm, com uma massa média entre 2,35 g e 4,88 g e uma relação polpa/caroço de 3,30 a 6,72. A variabilidade observada estará relacionada com a cultivar utilizada e com fatores agronómicos mas não permitiu efetuar qualquer distinção estatística entre grupos.

Nos parâmetros físico-químicos verificou-se que as azeitonas de mesa são maioritariamente constituídas por água (62,9% e 78,4%), seguida da gordura (10,2% e 26,6%), afetando diretamente o valor energético (131 Kcal e 267 Kcal). O teor em cinzas foi o grupo com maior variabilidade (0,33% e 7,08%). O perfil em ácidos gordos apresentou o ácido oleico, monoinsaturado, como claramente dominante (entre 68,28%, a 82,97%) e permitiu a separação estatística das amostras em 2 grupos. O teor em tocoferóis é reduzido, mas o α -tocoferol foi o isómero mais abundante em todas as amostras.

Ao nível da segurança microbiológica verificou-se que todas as amostras são seguras, tendo sido detetados sobretudo leveduras e microrganismos aeróbios mesófilos, com valores máximos de 1×10^6 UFC/ml e 2×10^5 UFC/ml, respetivamente, ambos na salmoura. Foram também identificadas oito leveduras na salmoura e cinco leveduras na polpa, todas características do processo. Verificou-se atividade da catalase em todas as espécies isoladas, e pontualmente algumas leveduras com capacidade de produzir β -glucosidase, proteases e amilases. Das espécies avaliadas, *S. roseus* foi aquela que apresentou um elevado potencial biotecnológico, em virtude de produzir todas as enzimas testadas.

Palavras-chave: Azeitonas de mesa; fermentação natural; caracterização morfológica; caracterização físico-química; ácidos gordos; tocoferóis; segurança microbiológica; identificação de leveduras; atividade enzimática.

Abstract

Table olives are a fermented product obtained from the fruit of the olive tree, *Olea europaea* L., an important food product in the Mediterranean region. The objective of this study was to contribute to the characterization of table olives produced in Trás-os-Montes, recognized as one of the most important producing regions in Portugal, as an input for the establishment of a new Protective Designation of Origin (PDO). For the purpose, 21 samples processed by natural fermentation in a traditional way, mostly from cultivars Cobrançosa and Negrinha de Freixo, were collected in the region and characterized for several morphological and physicochemical and 8 samples for microbiological parameters.

The morphological characterization revealed fruit lengths varying between 20.00 mm and 24.93 mm, with an average weight of 2.35 g to 4.88 g and a pulp/core from 3.30 to 6.72. The observed variability is known to be related with cultivar and agronomic factors but not distinct groups were statistically assembled. Regarding the physicochemical parameters, table olives are mainly constituted by water (62.9% to 78.4%), followed by fat (10.2% and 26.6%), affecting directly its energetic density (131 Kcal to 267 Kcal). The ash content was the parameter showing greater variability (0.33% and 7.08%). The total fatty acid profile was characterized by a clear dominance of oleic acid (68.3% of the 83.0%) and allowed the separation of the samples into two statistically different groups. The tocopherols content was reduced but α -tocopherol was the most abundant compound.

All samples were safe from the microbiological point of view, presenting mostly aerobic mesophilic bacteria and yeasts, with maximum values of 1×10^6 CFU/ml and 2×10^5 CFU/ml, respectively, both in the brine. Eight yeasts were identified in brine and five yeasts in the pulp, all characteristics of this technological process. All species presented catalase activity and some individual yeast were capable of producing β -glucosidase, proteases and amylases. Of the species studied, *S. roseus* was the only one producing all the enzymes tested, presenting therefore the highest biotechnological potential.

keywords: Table olives; natural fermentation; morphological characterization; physicochemical characterization; fatty acids; tocopherols; microbiological safety; yeast identification; enzymatic activity.



Capítulo 1

**Introdução e
objetivos**

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore importante nos países Mediterrânicos. O seu fruto, a azeitona, não pode ser consumido na sua forma natural, devido ao seu amargor, necessitando de sofrer transformações que o tornem palatável. Da azeitona podem obter-se diversos produtos, sendo os principais o azeite e as azeitonas de mesa.

No processamento de azeitonas de mesa, existem diversos métodos para remover o amargor de azeitonas não processadas, atribuído maioritariamente à oleuropeína. Os métodos mais comuns de preparação de azeitonas de mesa são: azeitonas verdes de Estilo Sevilhano, azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano) e azeitonas pretas ao natural (Estilo Grego) (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Dabbou *et al.*, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012; Tofalo *et al.*, 2012a).

O processamento por fermentação natural é o método mais comum em Portugal, nomeadamente em Trás-os-Montes, sendo o Estilo Sevilhano o que detém maior relevância mundial (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Tofalo *et al.*, 2012b).

Devido às suas características sensoriais, químicas e nutricionais, bem como ao seu elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados e, em menor proporção, aos tocoferóis e compostos fenólicos, as azeitonas de mesa são, cada vez mais consumidas e apreciadas em todo o mundo, sendo o produto fermentado mais comum na dieta mediterrânica.

Nas últimas duas décadas tem havido um crescimento progressivo na produção mundial de azeitonas de mesa, sendo prevista para a campanha de 2011/2012 uma produção de cerca de 2.565.000 toneladas, fazendo assim face ao consumo previsto que será cerca de 2.873.500 toneladas (COI, 2011).

O sector da Olivicultura tem uma enorme importância em Portugal, com uma área de cultivo de aproximadamente 346 000 hectares, sendo a cultura permanente com maior expressão, seguindo-se a vinha com aproximadamente metade deste valor (INE, 2011). Trás-os-Montes, detém considerável importância a nível económico, social e ambiental. Devido às condições pedológicas e climatéricas desta região, associadas às cultivares de azeitona tradicionais e às práticas culturais, o azeite e as azeitonas de mesa obtidos em Trás-os-Montes têm características únicas e são de excelente qualidade (Peres *et al.*, 2011). Esta qualidade e genuinidade têm sido reconhecidas pela criação da Denominação de Origem Protegida (DOP) “Azeite de Trás-os-Montes” e “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”, ambas produzidas exclusivamente na região.

Portugal é o quarto país na União Europeia com maior produção de azeitonas de mesa, depois de Espanha, Grécia e Itália. Nos últimos 10 anos, a produção nacional média anual foi cerca de 12 000 toneladas, registando alterações apreciáveis em termos de quantidades produzidas entre as 8 000 toneladas (2005/2006) e as 19 200 toneladas

(2006/2007). Assim, passou-se de uma situação em que o país era deficitário, até à campanha de produção de 2005/2006, para uma situação em que produzimos mais do que consumimos, a partir dessa campanha. Para o ano de 2011/2012 está prevista uma produção de 11 000 toneladas de azeitonas de mesa em Portugal e um consumo de cerca de 7 000 toneladas (COI, 2011).

No que respeita às cultivares de oliveira, apesar de todas poderem ser utilizadas para a produção de azeitonas de mesa, algumas possuem propriedades mais adequadas, nomeadamente o tamanho do fruto, o seu sabor, forma, firmeza, relação polpa/caroço e facilidade de desprendimento da polpa do respetivo caroço (Barranco *et al.*, 2001; Rejano *et al.*, 2010; Cabezas, 2011).

No nosso país existem cultivares de azeitona com diferentes aptidões. Um são ideais para a produção de azeite e outras para a produção de azeitona de mesa, existindo ainda algumas com dupla aptidão. Na Tabela 1 estão representadas algumas das cultivares existentes em Portugal, evidenciando as suas aptidões.

Tabela 1. Algumas cultivares de azeitona existentes em Portugal e respetivas aptidões (Leitão *et al.*, 1986; Monteiro, 1999).

Cultivares		
Azeite	Azeitona de Mesa	Dupla aptidão
Madural	Galega Vulgar	Cobrançosa
Verdeal Transmontana	Azeiteira	Carrasquenha
Picual	Negrinha	Redondil
	Gordal	Conserva
		Redondal
		Maçanilha
		Maçanilha Algarvia
		Cordovil de Serpa
		Cordovil de Castelo Branco
		Verdeal de Serpa
		Bical de Castelo Branco

As azeitonas de mesa de Trás-os-Montes gozam de grande popularidade e considera-se que possuem características únicas ao nível sensorial, que deverão ser caracterizadas e valorizadas. Neste sentido, e respondendo a uma solicitação da AOTAD (Associação de Olivicultores de Trás-os-Montes e Alto Douro), com o presente trabalho

pretende-se proceder à caracterização físico-química e microbiológica das diferentes amostras provenientes de produtores da região de Trás-os-Montes, como sendo um primeiro passo para a sua caracterização e valorização.

Este trabalho incide apenas em duas cultivares, Cobrançosa e Negrinha de Freixo, ambas com maior prevalência na região de Trás-os-Montes. Neste sentido é de referir que a *Cv. Cobrançosa* é utilizada principalmente para a produção de azeite (Alves, 2007), não sendo tipicamente utilizada para conserva, e é caracterizada pela sua boa resistência e produtividade, com frutos de tamanho médio, forma geralmente elipsoidal e bom rendimento em azeite. No entanto, nos últimos anos os frutos desta cultivar têm sido muito procurados para a elaboração de azeitonas de mesa e no mercado regional o preço desta azeitona em peso é, em muitos casos, superior ao da *Cv. Negrinha de Freixo*.

Por outro lado, a *Cv. Negrinha de Freixo* é utilizada principalmente para produção de azeitonas de mesa, tem frutos médios, de forma ovóide ou elipsoidal e apresenta fraco rendimento em azeite (Monteiro, 1999).

No contexto apresentado, e uma vez que a preparação de azeitonas de mesa tem tido um impulso crescente na região, os objetivos do presente trabalho são:

- Proceder à caracterização morfológica de diferentes amostras de azeitonas de mesa produzidas na região de Trás-os-Montes;
- Proceder à sua caracterização físico-química, incidindo na determinação do teor de humidade, gordura, proteína bruta e cinzas de cada uma das amostras, e no cálculo do teor em hidratos de carbono e valor energético;
- Determinar o seu perfil em ácidos gordos por GC/FID e a composição em tocoferóis por HPLC/FD;
- Verificar a sua segurança microbiológica, de modo a atestar se são seguras para o consumidor.

Em termos gerais pretende-se obter conhecimento que possa ser integrado na criação de uma DOP de “Azeitonas de mesa de Trás-os-Montes”.



Capítulo 2

Caraterização das Azeitonas de Mesa

2.1. Definição de “Azeitonas de Mesa”

Entende-se por “Azeitonas de mesa” o produto preparado a partir de frutos são de variedades da espécie *Olea europaea* L., escolhidos consoante as suas características físico-químicas e que os tornam adequados para o processamento de azeitonas de mesa, processados para remover o seu amargor, conservados por meios que assegurem a sua estabilidade e evitem a sua deterioração em condições normais de armazenamento, com ou sem adição de conservantes e embalados, com ou sem um meio líquido (*Codex Alimentarius*, 2010).

Também de acordo com a Norma Portuguesa NP – 3034 (1987), deve-se ter em atenção a escolha das cultivares adequadas para preparação de azeitonas de mesa, bem como saber que os frutos tratados com pesticidas cujos resíduos não possam ser eliminados ou reduzidos a teores inócuos, não devem ser utilizados.

2.2. Anatomia geral do fruto da Oliveira - *Azeitona*

A oliveira (*O. europaea*) é uma árvore pertencente à família *Oleaceae* e é a única espécie desta família que produz frutos comestíveis (COI, 1996; Barranco *et al.*, 2001).

O fruto da oliveira tem a estrutura básica de uma drupa, sendo constituído por três tecidos principais: epicarpo (pele), mesocarpo (polpa) e endocarpo (caroço), mas exhibe algumas diferenças morfológicas e físico-químicas que o tornam distinto das restantes drupas (Fernández *et al.*, 1997; Barranco *et al.*, 2001; Cabezas, 2011; Hammami *et al.*, 2011).

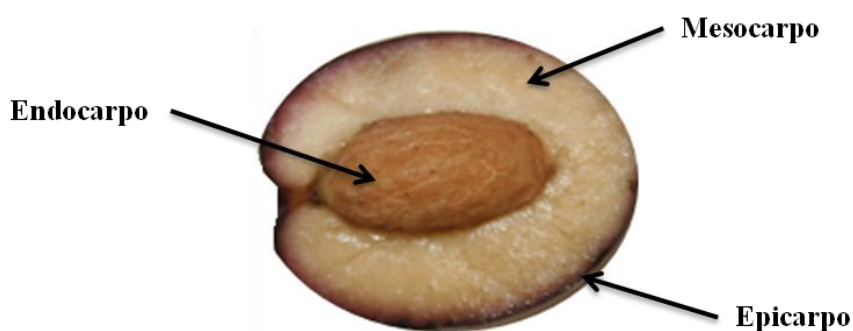


Figura 1. Corte transversal de uma azeitona, expondo os seus diferentes constituintes.

A colheita do fruto decorre a partir de setembro até ao início do Inverno, e a sua maturação varia de um forma dependente tanto da cultivar como das características

desejadas para o produto final (Galanakis, 2011). A azeitona pode apresentar colorações distintas, variando desde o verde ao negro-púrpura (Pinheiro *et al.*, 2005; Cabezas, 2011).

O processo de crescimento e amadurecimento da azeitona pode demorar cerca de 5 meses em condições climáticas normais (Ghanbari *et al.*, 2012), sendo o tamanho dos frutos, na sua globalidade, influenciado por diversos fatores, como a disponibilidade de água, a temperatura ou as diferenças genéticas entre as cultivares (Hammami *et al.*, 2011). O tecido que apresenta maior dimensão é o mesocarpo, que representa cerca de 84-90% do peso total fruto (Galanakis, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012), e o endocarpo, mas o seu tamanho está dependente da variedade ou cultivar (Hammami *et al.*, 2011).

Para a produção de azeitonas de mesa são mais adequados os frutos maiores (peso unitário superior a 4 g) e com uma maior quantidade de polpa relativamente ao caroço, no entanto a forma e textura do fruto também revelam alguma importância (Ghanbari *et al.*, 2012).

2.3. Classificação das Azeitonas

Segundo o *Codex Alimentarius* (2010) e o Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004), pode considerar-se três tipos de azeitona de mesa, consoante o grau de maturação dos frutos:



Azeitonas verdes: Frutos colhidos durante o período de amadurecimento (no início do Outono) e que tenham atingido o tamanho normal. A cor do fruto pode variar de verde a amarelo-palha.



Azeitonas mistas: Frutos colhidos antes de atingirem a completa maturação, no Inverno, com uma cor variável entre tons rosados e acastanhados.



Azeitonas pretas: Frutos colhidos em plena maturação ou ligeiramente antes. A cor do fruto pode variar de negro-avermelhado a castanho-escuro, passando por tons violáceos, atendendo à zona de produção e época de colheita.

A classificação apresentada apenas diz respeito ao tipo de azeitonas que estão na origem da azeitona de mesa. Ainda de acordo com as normas apresentadas no *Codex Alimentarius* (2010), tendo em conta os diferentes processos tecnológicos, podemos ter azeitonas com diferentes designações, entre as quais:



Azeitonas verdes, mistas ou pretas tratadas: são submetidas a um tratamento alcalino, embaladas em salmoura, onde ocorre fermentação parcial ou completa, e preservadas ou não por agentes acidificantes.



Azeitonas verdes, mistas ou pretas ao natural: são directamente colocadas em salmoura, onde ocorre fermentação parcial ou completa, e preservadas ou não por agentes acidificantes.



Azeitonas verdes, mistas ou pretas desidratadas ou enrugadas: são submetidas ou não a um tratamento alcalino, conservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas em sal seco e/ou por aquecimento ou por qualquer outro processo tecnológico.



Azeitonas verdes ou mistas escurecidas por oxidação: são conservadas em salmoura, ocorrendo ou não fermentação, e escurecidas por oxidação com ou sem meio alcalino, devendo ser conservadas em recipientes herméticos e esterilizadas pelo calor.



Especialidades: são azeitonas de mesa preparadas segundo outros métodos, distintos dos anteriores. Pode-se considerar como exemplo as "alcaparras".

No entanto, as azeitonas de mesa podem ainda ser apresentadas em diferentes estilos, sendo alguns exemplos:



Azeitonas inteiras: Com forma natural, não descaroçadas, com ou sem pedúnculos;

- Retalhadas: azeitonas inteiras onde a polpa é golpeada sem quebrar o caroço;
- Divididas: azeitonas inteiras que sofrem um corte longitudinal da pele e de parte da polpa.



Azeitonas descaroçadas: Com forma natural, às quais foi retirado o caroço;

- Divididas: azeitonas cortadas em duas partes aproximadamente iguais, podem ser recheadas;
- Em quartos: azeitonas divididas em quatro partes aproximadamente iguais;
- Em fatias: azeitonas divididas em mais de quatro partes aproximadamente iguais;
- Picadas: azeitonas desprovidas de forma definida ou de fragmentos de fatia;
- Quebradas: azeitonas partidas enquanto são descaroçadas, podem ser recheadas.



Azeitonas recheadas: azeitonas descaroçadas e recheadas com diversos produtos, tais como: pimento, cebola, avelã, amêndoas, aipo, anchôva, de laranja, casca de limão, azeitonas ou com pastas de azeitona.



Pasta de Azeitona: Obtida exclusivamente a partir da polpa de azeitona triturada.

2.4. Métodos de Preparação

O processamento das azeitonas tem como principal objetivo a remoção da amargura dos frutos por hidrólise dos compostos fenólicos, especialmente oleuropeína (Aponte *et al.*, 2010), o composto fenólico mais abundante nas azeitonas não processadas (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Parinos *et al.*, 2007). Existem vários métodos distintos de região para região (Arroyo-López *et al.*, 2008), que podem resultar em diferentes tipos de fermentações, mas que na sua globalidade se devem à atividade microbiana presente, essencialmente *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido lácticas e leveduras, que permitem modificações no aroma e sabor do produto final, mas também na sua qualidade (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Dabbou *et al.*, 2012; Tofalo *et al.*, 2012a).

Os métodos de processamento das azeitonas de mesa com maior importância a nível internacional são as azeitonas de fermentação natural (Estilo Grego), as azeitonas verdes (Estilo Sevilhano ou Espanhol) e as azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano ou Americano) (Aponte *et al.*, 2010; Malheiro *et al.*, 2012; Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012). Para além dos aspetos culturais, a escolha do método de processamento deverá ter em conta a cultivar, o estado de maturação do fruto e a tecnologia de transformação disponível (Dabbou *et al.*, 2012).

Independentemente do tipo de processamento optado, este deve ser realizado respeitando o código de boas práticas sanitárias, de modo a garantir características químicas e microbiológicas corretas (Dabbou *et al.*, 2012).

De seguida far-se-á uma breve descrição dos métodos mais utilizados.

Azeitonas de Fermentação Natural

Para a preparação de azeitonas de fermentação natural os frutos devem ser colhidos em estado de maturação conveniente, com uma textura suficientemente firme (Pereira *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011). No entanto, dependendo da região de produção e da época de colheita, os frutos podem apresentar colorações que variam desde verde a avermelhado-escuro e serem igualmente ideais para a preparação deste tipo de azeitonas (Fernández *et al.*, 1997).

Após a sua colheita, procede-se ao transporte das azeitonas para a unidade industrial, o mais rapidamente possível de modo a evitar a sua deterioração, onde são escolhidas, para remover os frutos com defeitos, calibradas e posteriormente lavadas com água para remover a sujidade superficial (Fernández *et al.*, 1997; Nychas *et al.*, 2002).

Posteriormente, as azeitonas são colocadas diretamente numa salmoura (Campaniello *et al.*, 2005; Cabezas, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012), sem nenhum processo prévio para remover o seu amargor, com uma concentração de sal que pode variar entre 8 a 10% (Panagou *et al.*, 2008; Rejano *et al.*, 2010), embora em zonas mais frias se possam utilizar concentrações inferiores, próximas dos 6% (Nychas *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006).

Inicia-se assim uma fermentação natural e espontânea, que se pode dar em condições de anaerobiose ou aerobiose, e pela qual é responsável, na sua maioria, uma complexa microflora de leveduras, cuja atividade é estimulada pela elevada quantidade de sal utilizada (Hurtado *et al.*, 2008; Aponte *et al.*, 2010). No entanto também interagem bactérias Gram-Negativas e bactérias ácido-lácticas (Panagou *et al.*, 2011), sendo estas parcialmente inibidas devido à presença de compostos fenólicos (Bautista-Gallego *et al.*, 2011). Durante o processo de fermentação, a hidrólise da oleuropeína é atribuída ao pH ácido e à actividade da β -Glucosidase produzida pelas leveduras (Psani & Kotzekidou, 2006).

A fermentação destas azeitonas é lenta, devido à demorada difusão dos compostos solúveis através da pele da azeitona para o exterior, bem como à lenta solubilização da própria oleuropeína na salmoura, sendo o equilíbrio alcançado entre 8 a 12 meses (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008), quando todos os substratos fermentáveis (na sua maioria açúcares) se esgotam (Cardoso *et al.*, 2010).

O processo de fermentação é assim limitado pela flora microbiana disponível que, por sua vez, depende da disponibilidade dos substratos fermentáveis, do conteúdo de sal, do pH e da temperatura, bem como das condições de anaerobiose ou aerobiose utilizadas e dos compostos antimicrobianos presentes, como os compostos fenólicos. Neste sentido, de modo a melhorar a fermentação e produzir produtos de melhor qualidade, é necessário controlar estes parâmetros que influenciam o metabolismo da microflora existente (Nychas *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012b).

Depois do processo de fermentação as azeitonas são oxidadas por exposição ao ar, de modo a melhorar a sua cor, não devendo este passo demorar mais de 48 h para que não ocorra enrugamento das mesmas (Gómez *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010).

A fração fenólica das azeitonas é de extrema importância no que respeita às suas características físicas e sensoriais (Marsílio *et al.*, 2001b), revelando também propriedades antioxidantes (Othman *et al.*, 2009) e antimicrobianas (Sousa *et al.*, 2006), sendo essencial referir que os principais compostos fenólicos presentes nas azeitonas pretas antes de sofrerem a fermentação natural são a oleuropeína, hidroxitirosol, hidroxitirosol-4- β -

glucósido, tirosol, salidroside e verbascosídeo, enquanto após 12 meses de fermentação os principais compostos fenólicos passam a ser o hidroxitirosol, seguido por hidroxitirosol acetato, tirosol acetato e tirosol (Romero *et al.*, 2004).

Após o processo de oxidação as azeitonas podem ser embaladas numa nova salmoura apropriada e comercializadas (Fernández *et al.*, 1997), devendo ser garantida a sua conservação após o embalamento, mediante processos de pasteurização ou esterilização do produto (Cabezas, 2011), ou adição de substâncias conservantes, como o sorbato de potássio ou sorbato de sódio (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006).

É de salientar que as azeitonas produzidas segundo o método de fermentação natural, com ou sem adição de substâncias aromáticas, têm um sabor a fruto mais acentuado e conservam um ligeiro amargor, devido essencialmente à presença de polifenóis residuais, originando um produto de alto valor nutritivo, com uma textura e cor característicos (Barranco *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Kanavouras *et al.*, 2005; Cabezas, 2011; Panagou *et al.*, 2011).

Azeitonas verdes (Estilo Espanhol ou Sevilhano)

O primeiro passo para o processamento de azeitonas de estilo espanhol é a colheita dos frutos com uma coloração verde ou verde-palha (Fernández *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2004). De seguida as azeitonas são transportadas para a unidade industrial onde são escolhidas e classificadas por tamanho, e sofrem um tratamento alcalino com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), de modo a remover quimicamente o seu amargor (Gómez *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012), e a aumentar a permeabilidade da parede celular (Arroyo-López *et al.*, 2008), ocorrendo essencialmente hidrólise da oleuropeína, que é lábil em condições alcalinas (Parinos *et al.*, 2007). Este tratamento deve durar até que o NaOH atinja cerca de dois terços da polpa (Parinos *et al.*, 2007; Rejano *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012). A concentração de NaOH adequada depende de vários fatores como a temperatura, a cultivar, o grau de maturação dos frutos aquando do momento da colheita (Fernández *et al.*, 1997) e a qualidade da água da salmoura (Rejano *et al.*, 2010).

Após o tratamento alcalino, os frutos são submetidos a alguns ciclos de lavagens com água, por períodos de tempo variáveis, para remover o excesso de NaOH (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Castro & Brenes, 2001) e são colocados numa salmoura com concentração de

NaCl variável entre 6-8%, onde sofrem uma fermentação láctica espontânea, principalmente por bactérias lácticas (Montaño *et al.*, 2003; Panagou *et al.*, 2006b; Aponte *et al.*, 2010; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012). A duração da fermentação depende das características do tratamento alcalino prévio, da cultivar, da temperatura, da população microbiana presente (Fernández *et al.*, 1997) e da presença de compostos inibidores, como os compostos fenólicos (Brenes *et al.*, 1995).

Na fermentação podem ser identificadas quatro fases distintas, caracterizadas pelo crescimento de diferentes populações microbianas (Montaño *et al.*, 2003). Na primeira fase as principais espécies presentes são bactérias Gram-negativas, na sua maioria pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A segunda fase começa normalmente quando o pH do meio baixa para 6 e dura cerca de duas semanas, havendo um crescimento progressivo de bactérias ácido-lácticas e leveduras e uma diminuição gradual de bactérias Gram-negativas. Na terceira fase ocorre um abundante crescimento de *Lactobacillus*, principalmente *Lactobacillus plantarum* tornando-se a espécie dominante na fermentação (Fernández *et al.*, 1997; Panagou *et al.*, 2006a; Rejano *et al.*, 2010). O crescimento desta bactéria láctica provoca o aumento da acidez do meio, pelo aumento da produção de ácido láctico, obtendo-se assim valores de pH muito baixos (Panagou *et al.*, 2006b). A quarta fase começa quando maioria dos substratos fermentáveis termina, ocorrendo diminuição do ácido láctico e um ligeiro aumento do pH, sendo a principal género presente a *Propionibacterium* (Fernández *et al.*, 1997; Barranco *et al.*, 2001). No entanto, a população microbiana existente na salmoura é também influenciada pela microbiota natural presente nas azeitonas, por fatores intrínsecos do fruto como o pH, atividade da água ou pelos níveis de compostos com atividade antimicrobiana, como a oleuropeína, e por factores extrínsecos ao fruto, como a temperatura, a disponibilidade de oxigénio e a concentração de sal na salmoura (Hurtado *et al.*, 2008).

Quando ocorrer o esgotamento dos substratos fermentáveis e a fermentação estiver concluída, as azeitonas são novamente escolhidas e classificadas por tamanhos e são acondicionadas inteiras, descaroadas ou recheadas (Gómez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008). De modo a estabilizar e a garantir a preservação do produto final, as azeitonas embaladas podem ser ainda submetidas a um processo de pasteurização (15 minutos a 62,4°C) (Fernández *et al.*, 1997).

Azeitonas pretas oxidadas (Estilo Californiano ou Americano)

As azeitonas usadas para a preparação de azeitonas pretas oxidadas podem ser colhidas em períodos muito variáveis, podendo apresentar vários estados de maturação, com coloração desde o verde ao negro (Fernández *et al.*, 1997; Mafra *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2004).

Antes do processamento as azeitonas podem ser armazenadas durante 2 a 6 meses, dependendo das necessidades de produção, sob condições anaeróbias numa salmoura com uma concentração de NaCl de 5-10% (Bianchi, 2003; Mafra *et al.*, 2003), ou podem ser sujeitas diretamente a processos de oxidação sem qualquer tipo de preservação (Gómez *et al.*, 2006; Ghanbari *et al.*, 2012).

As azeitonas são sujeitas a tratamentos sucessivos com soluções de hidróxido de sódio (NaOH), por períodos de tempo variáveis, de modo que ocorra uma penetração progressiva desde a pele à polpa e, por fim, ao caroço (Marsílio *et al.*, 2001b). Entre cada tratamento as azeitonas são arejadas através de passagens de ar pelo líquido, de modo a que estas sejam oxidadas uniformemente (Mafra *et al.*, 2003; Arroyo-López *et al.*, 2010). A concentração das soluções de NaOH depende do estado de maturação dos frutos, da cultivar, da temperatura do tratamento e da penetração desejada (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010).

É necessário salientar a importância dos compostos fenólicos neste processo, pois estes representam o substrato para as enzimas oxidativas, essenciais para a formação da cor negra característica destas azeitonas (Marsílio *et al.*, 2001b)

Após lavagens com água para remover o excesso de NaOH e baixar o pH da polpa para cerca de 8 (Marsílio *et al.*, 2001b; Bianchi, 2003), são adicionados sais de ferro, como o gluconato ferroso ou lactato ferroso, para melhorar e manter a cor preta das azeitonas (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008).

Por fim, as azeitonas são escolhidas e embaladas em salmoura, em diferentes recipientes, contendo ainda uma ligeira quantidade de um dos sais de ferro mencionados, de forma a prevenir a deterioração da cor negra. Pode-se garantir a conservação do produto final, sujeitando-o à esterilização pelo calor (Ghanbari *et al.*, 2012), à adição de ácidos, como o ácido láctico ou glucónico, que o tornam um produto acidificado (pH < 4,6), ou a pasteurizações (Gómez *et al.*, 2006).

As azeitonas podem ser acondicionadas com diversas formas de apresentação como inteiras, descaroçadas, fatiadas ou em pasta de azeitona (Gómez *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008).

Na Figura 2 apresenta-se uma breve esquematização dos três métodos mais utilizados.

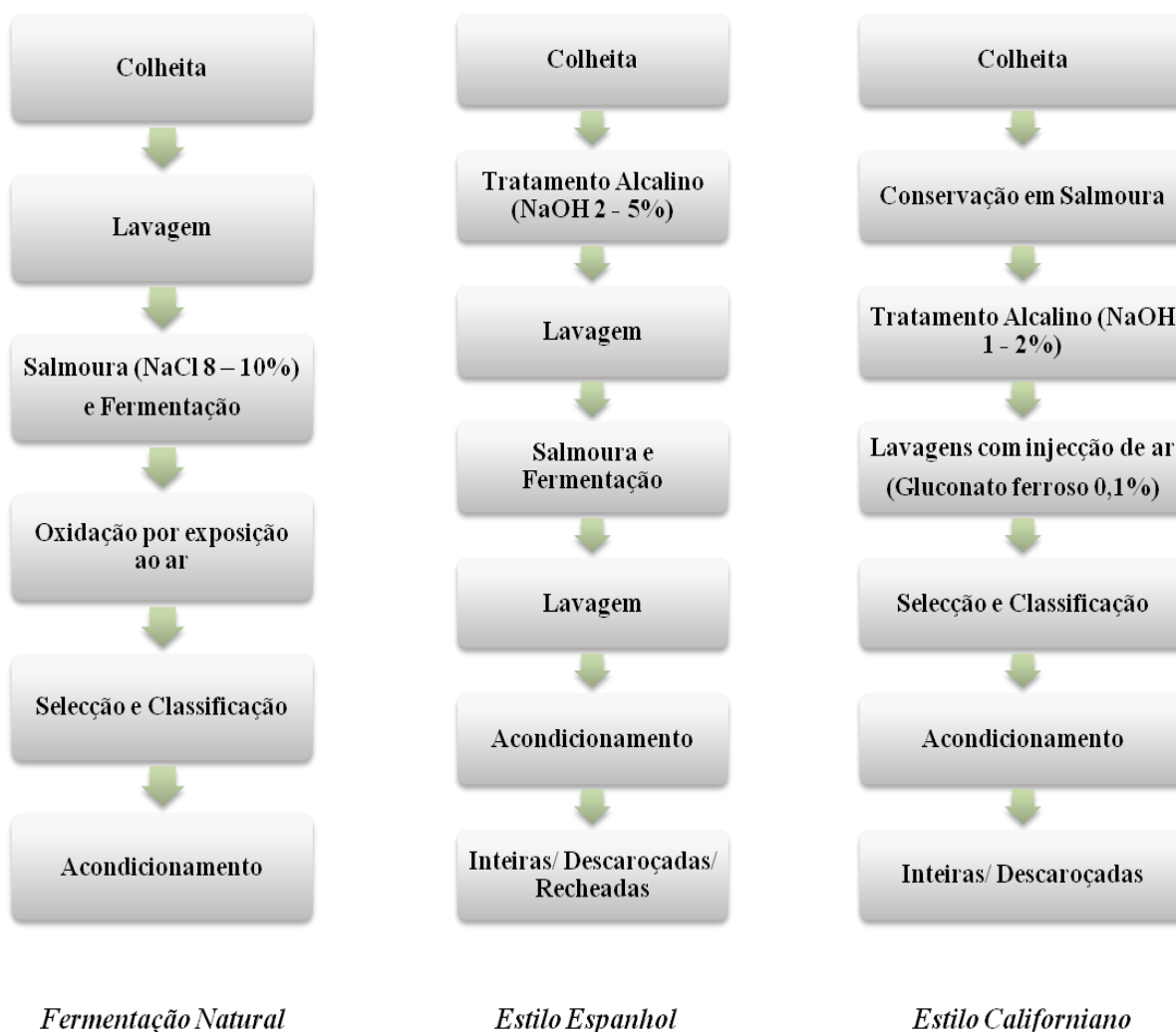


Figura 2. Síntese dos três principais métodos de processamento de Azeitonas de Mesa.

Outros tipos de preparações

Existe um grande número de preparações para além dos mencionados, no entanto a sua importância é, de uma maneira geral, revelada ao nível regional ou local.

A título de exemplo referem-se dois tipos de preparações tradicionalmente Gregas. As azeitonas negras do tipo “Kalamata”, cuja preparação envolve essencialmente o corte das azeitonas e a sua colocação em vinagre ou salmoura, que lhes confere uma coloração escura e um sabor predominantemente avinagrado e amargo, e as azeitonas pretas naturais “Estilo Thurba”, produzidas a partir da Cv. Thurbolea, caracterizadas por perderem o seu amargor diretamente na oliveira, sem necessitarem de fermentação, sendo apenas desidratadas ao sol (Fernández *et al.*, 1997).

Outro exemplo são as “Alcaparras” produzidas na região de Trás-os-Montes, em Portugal. Neste tipo de preparação as azeitonas são descaroadas e a polpa é imersa em água, que deve ser trocada três a quatro vezes durante uma semana, para remover o seu amargor. Após este processo as azeitonas podem ser salgadas e consumidas aromatizadas com especiarias ou azeite. (Malheiro *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2011).

De uma maneira geral, os métodos de processamento considerados tradicionais constituem exceções relativamente aos métodos mencionados anteriormente.

2.5. Composição Química

A qualidade das azeitonas de mesa, enquanto produto final, está intimamente relacionada com a sua composição química e propriedades físicas. A composição química das azeitonas pode variar, dependendo de diversos fatores como: cultivar (Conde *et al.*, 2008; Ghanbari *et al.*, 2012), aspetos agronómicos (Sousa *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2012); regime de irrigação (Ghanbari *et al.*, 2012), métodos de processamento (Montaño *et al.*, 2005; Dabbou *et al.*, 2012), condições climáticas e estado de desenvolvimento e maturação do fruto na altura da colheita (Conde *et al.*, 2008).

O método de processamento das azeitonas de mesa contribui para alterações na sua composição química, no sentido em que provoca o aumento dos teores de água e sal durante a penetração do NaCl no fruto, bem como uma redução no teor em hidratos de carbono, em particular os açúcares solúveis, que são consumidos pelos microrganismos durante a fermentação para obtenção de energia e carbono. Pode ainda provocar a perda de alguns constituintes minoritários, mas não com inferior importância, como os compostos fenólicos (Fernández *et al.*, 1997; Marsílio *et al.*, 2001a; Ünal & Nergizb, 2003; Malheiro *et al.*, 2012).

A qualidade textural da polpa de azeitona é diretamente influenciada pelo seu conteúdo em polissacarídeos e substâncias pécicas. Durante o processamento e armazenamento das azeitonas as substâncias pécicas são hidrolisadas por enzimas pécicas, ocorrendo uma diminuição da firmeza do fruto (Bianchi, 2003).

O mesocarpo é maioritariamente constituído por água, de 70 a 75%, e uma fração lipídica que varia de 12 a 30%, dependendo do estado de maturação das azeitonas e da variedade (Bianchi, 2003; Pinheiro *et al.*, 2005). Apresenta um teor relativamente baixo em açúcares (2-5%), prevalecendo a glucose (1 a 3% do peso da polpa) e a frutose (0,1 a 1,1%) comparativamente à sacarose e ao manitol, e em proteínas (3%), sendo o restante

constituído por fibra e minerais (Fernández *et al.*, 1997; Bianchi, 2003; Conde *et al.*, 2008; Sakouhi *et al.*, 2008).

Quanto à composição lipídica, a maioria dos ácidos gordos são monoinsaturados, sendo a sua proporção regulada por fatores genéticos como a cultivar, mas também por fatores pedológicos como as condições ambientais (Malheiro *et al.*, 2012). O ácido oleico (C_{18:1}) é o ácido gordo mais abundante nas azeitonas de mesa, seguindo-se o ácido palmítico (C_{16:0}) e o ácido linoleico (C_{18:2}), sendo o teor em ácidos gordos saturados inferior a 15% do total de lípidos (Conde *et al.*, 2008; Sakouhi *et al.*, 2008; Malheiro *et al.*, 2012).

Ainda na fração lipídica é possível detetar compostos com atividade antioxidante e vitamínica, que conferem proteção contra a peroxidação lipídica, como sejam os tocoferóis, sendo o α -tocoferol o que se apresenta em maior quantidade, variando entre 2,26 e 5,66 mg/kg (Sousa *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012), sendo este valor dependente da cultivar (Sakouhi *et al.*, 2008), e estando a sua ação vitamínica particularmente associada à proteção do organismo contra os radicais livres (Sousa *et al.*, 2011).

Os ácidos orgânicos apresentam atividade metabólica e resultam da formação e transformação de outros compostos (Ghanbari *et al.*, 2012). No entanto, o teor em ácidos orgânicos, nomeadamente em ácidos oxálico, succínico, málico e cítrico, pode variar numa percentagem entre 1,2 a 2,1% do peso da polpa em matéria seca, e a sua concentração aumenta até à maturação, estabilizando quando esta é atingida (Bianchi, 2003). É de salientar que os ácidos láctico, acético e propiónico são os que predominam na salmoura, contrariamente aos principais encontrados na polpa, que são os ácidos cítrico e málico (Panagou *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012b).

O teor em cinzas não varia de forma muito considerável com a cultivar e pode apresentar valores entre 1,6 – 1,9% (Malheiro *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos e secoiridoides têm influência nas características sensoriais da azeitona, enquanto fruto fresco (Vinha *et al.*, 2005), mas também apresentam enorme importância nas propriedades químicas, organolépticas e nutricionais do azeite virgem e das azeitonas de mesa (Rodríguez *et al.*, 2009).

Os polifenóis, antioxidantes naturais, constituem um dos principais metabolitos secundários da azeitona, representando cerca de 2,0 - 2,5% da polpa (Pereira *et al.*, 2006). A diminuição da concentração da oleuropeína promove o aumento de outros compostos como o hidroxitirosol, que se torna o principal composto fenólico nas azeitonas de mesa processadas, bem como o tirosol, a rutina, a quercitina e os ácidos cafeico, vanílico e σ - e ρ -coumarico (Romero *et al.*, 2004; Malheiro *et al.*, 2012).

2.6. Proteções Institucionais de Azeitonas de Mesa em Portugal

Uma Denominação de Origem Protegida (DOP) é a designação dada a um produto cuja produção, transformação e elaboração ocorrem numa área geográfica delimitada, com um saber fazer reconhecido e verificado, que conferem ao produto características únicas.

Em Portugal, existem duas DOP de azeitonas de mesa, que serão apresentadas resumidamente.

Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo

As “Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo” foram criadas pelo despacho normativo nº 293/93, de 1 de Outubro, e as suas principais características podem ser encontradas no caderno de especificações disponível em <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName.html?denominationId=111>.

São consideradas “Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo”, com Denominação de Origem Protegida (DOP), as azeitonas produzidas a partir da Oliveira *Olea europaea sativa* Hoffg Link, da cultivar Negrinha de Freixo, produzidas numa área geográfica delimitada, constituída pelos 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.

Para a preparação destas azeitonas devem ser utilizados frutos sãos, inteiros, em estado de maturação apropriado, cuja cor vai do verde amarelado ao negro violáceo, isentos de defeitos e matérias estranhas, com forma arredondada lisa terminando num ligeiro bico, consistência firme, peso de 3 a 5g e volume de 3 a 5 cm³. O caroço é pequeno e destaca-se facilmente da polpa.

Esta cultivar apresenta um rendimento em gordura de 12 a 15% e a percentagem da polpa é de cerca de 83%, tendo assim mais aptidão para produção de azeitonas de mesa do que azeite.

Só são permitidas as azeitonas provenientes de olivais que não tenham sofrido aplicação de pesticidas ou tratamentos fitossanitários. A colheita é feita manualmente e, posteriormente, a azeitona é calibrada. Só podem ser consideradas DOP as azeitonas classificadas na categoria extra e calibradas nas classes de 201 a 400 frutos/Kg, de acordo com os critérios e tolerâncias estabelecidos na NP – 3034 (1987).

A apresentação comercial pode ser feita sob três aspetos, consoante o tratamento:

- Azeitona Tipo Verde: Azeitonas são preparadas em salmoura, sendo os frutos colhidos de cor verde a verde amarelado e tratados com uma solução diluída de hidróxido de sódio de 1,5% a 2,5%. De seguida são realizadas lavagens com água para eliminar a soda e são colocadas em salmoura a cerca de 10%, onde se produz a fermentação láctica. Depois de terminada a fermentação, podem-se comercializar em embalagens de vários tamanhos, inteiras ou descaroçadas.
- Azeitonas Negras Tratadas: Azeitonas são obtidas a partir de frutos não totalmente maduros, colhidos na mudança da cor verde para negro violáceo, enegrecidos por oxidação, sendo o amargo eliminado por um ou vários tratamentos com solução de hidróxido de sódio, seguidos de lavagens com água e submersão dos frutos numa solução de gluconato ferroso a 0,1%, para fixar a cor. São embalados em salmoura e conservados pelo calor ou pela adição de acidificantes.
- Azeitonas Maduras em Salmoura: Azeitonas são produzidas a partir de frutos colhidos em plena maturação ou um pouco antes, apresentando uma cor negra violácea uniforme. As azeitonas são colocadas em salmoura a 8 - 10%, onde sofrem uma fermentação, durante 6 a 9 meses até perderem o sabor amargo mas mantendo o sabor de fruto. O enegrecimento é feito por exposição ao ar durante a escolha e classificação dos frutos que são comercializados em latas de 10 a 15kg de peso escurido.

Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior

As “Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior” foram criadas pelo Regulamento (CEE) N° 2081/92 do Conselho, e as suas principais características podem ser encontradas no caderno de especificações disponível em <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName.html?denominationId=112>.

Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior são o produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea sativa* Hoffg Link (cultivares Azeiteira, Carrasqueira, Redondil e Conserva), em estado de maturação conveniente, provenientes exclusivamente de olivais localizados nos concelhos de Elvas e Campo Maior.

Dos processos tecnológicos admitidos destacam-se a Cura em salmoura de azeitona verde adoçada, a Cura em salmoura de azeitona verde ao natural pisada (britada) e a Cura em salmoura de azeitona mista ao natural retalhada.

A escolha das cultivares Azeiteira, Carrasquenha, Redondil e Conserva centra-se no facto destas cultivares apresentarem um reduzido rendimento em azeite e uma alta produtividade, tendo assim uma maior aptidão para conserva em verde.

Relativamente às características físicas destas azeitonas, devem apresentar cor verde-claro a verde amarelado, no caso das azeitonas verdes, e verde-claro a negro para as azeitonas mistas. O calibre vai desde os 240 aos 360 frutos/kg, dependendo do processo de transformação que irão sofrer. Estas cultivares de azeitonas apresentam uma relação polpa/caroço superior a 5 e fácil descarçamento.

Quimicamente, as “Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior” apresentam um pH igual ou menor que 4, acidez livre superior a 0,6 g/100 ml de ácido láctico e cloreto de sódio entre 6,5 e 7,5 g/100 ml de salmoura.

A colheita de azeitonas deve ser feita manualmente ou por ripagem, evitando danos nos frutos, e o estado de maturação das azeitonas depende do processo de transformação a que estão destinadas. Para o transporte das azeitonas são permitidas caixas plásticas perfuradas, com capacidade média de 20 kg.

Independentemente do tipo de preparação comercial a que as azeitonas vão ser sujeitas, deve ser realizada a classificação, escolha e limpeza dos frutos. Azeitonas são assim classificadas por calibre e selecionam-se as que se apresentam danificadas e em estado de maturação diferente do adequado. Só podem ser usados frutos inteiros, são, limpos e bem conformados relativamente à variedade, de maturação apropriada, não despelados e de consistência adequada. Tem de se efetuar uma lavagem para remoção das partículas estranhas aderentes ao fruto.

A cura em salmoura de azeitona verde consiste no tratamento das azeitonas com solução diluída de hidróxido de sódio de 1,0 a 2,6 %, para eliminar o amargor do fruto, seguida de lavagem com água e salmoura com concentração de 8 a 10 %, para que ocorra a fermentação.

O segundo processamento, cura em salmoura de azeitona verde ao natural pisada (britada), consiste em separar as azeitonas inicialmente por calibre, sendo o permitido de 240 a 260 frutos/kg. As azeitonas são britadas, de modo a não extrair nem esmagar o caroço, e são colocadas em água até perder o amargor, devendo a água ser mudada todos os dias. Depois deste processo colocam-se em salmoura com concentração de 8 a 10 % e adicionam-se orégãos.

O processo de preparação de azeitona mista retalhada consiste em colocar as azeitonas em salmoura com concentração de 8 a 10 % para que se dê a fermentação e, de seguida, retalha-las em máquina própria.

Posteriormente, e sendo comum aos três processos, as azeitonas são acondicionadas em recipientes de material inócuo, impermeável e inerte em relação ao produto, podendo ser usadas embalagens de vidro ou plástico.

É de salientar que todos os processos envolvidos na criação das DOP têm de ser realizados na área geográfica de produção de cada produto, de forma a assegurar a sua autenticidade enquanto proteção institucional.

Na Figura 3 é visível logotipo de DOP, aplicado em todos os produtos com esta denominação de qualidade, e um exemplo de logotipo representativo das “Azeitonas de conserva de Elvas e Campo Maior”.



Figura 3. Exemplo de Logotipo de denominação de origem protegida (DOP) e das azeitonas de conserva de Elvas e Campo Maior.

2.7. Proteções Institucionais de Azeitonas de Mesa na Europa

A nível europeu existem diversas azeitonas com DOP. A maioria delas encontra-se na Grécia, sendo alguns exemplos a “Konservolia Stilidas”, “Konservolia Amfissis”, “Konservolia Rovion”, “Konservolia Atalantis”, “Konservolia Piliou Volou”, “Troupa Thassou”, “Prasines Elies Chalkidis” e “Kalamata”; em Espanha, nomeadamente a “Aceituna Aloreña de Málaga” e as “Aceitunas de Campo Real”; em França, como as “Olive de Nimes”, “Olives noires de Nyons”, “Olives de Nice”, “Olives cassées de la Vallée des Baux de Provence” e “Olives noires de la Vallée des Baux de Provence”; e em Itália, “La Bella della Daunia”, “Nocellara del Belice” e “Oliva Ascolana del Picano”. (Comissão Europeia, 2012)

A título de exemplo pode-se caracterizar a DOP “Aceituna Aloreña de Málaga” como sendo produzida a partir da Cv. Aloreña, segundo o método de fermentação natural, na Andaluzia. As “Olive de Nimes” processadas a partir da Cv. Picholine (a mais difundida na França), distinguem-se pelos seus aromas a manteiga e avelãs e sabor salgado. As

azeitonas “La Bella della Daunia” são produzidas na província de Foggia, no sul de Itália, e são obtidas a partir da Cv. Bella di Cerignola, de cor verde ou negra. A “Oliva Ascolana del Picano” é produzida a partir da Cv. Ascolana, que origina um produto crocante, de sabor delicado e travo amargo. (Comissão Europeia, 2012).



Capítulo 3

Material e Métodos

3.1. Caracterização das Amostras

A recolha das amostras para a caracterização físico-química para este estudo ocorreu em janeiro de 2011, em diferentes regiões de Trás-os-Montes (Tabela 2), incidindo em produtores tradicionais de cada região.

Foram recolhidas vinte e uma amostras de azeitonas de mesa, tendo sido todas produzidas segundo o método de fermentação natural.

As diferenças entre as amostras recolhidas centram-se em vários aspetos, tais como: o tipo de azeitonas (azeitonas verdes, mistas ou pretas ao natural), como se pode verificar na Figura 4, o ano de colheita e produção das azeitonas, que vai desde 2008 a 2011, e a cultivar (Cobrançosa ou Negrinha de Freixo), segundo indicação do produtor. Uma vez que eram muitos locais não existe uma clara identificação da cultivar, sendo que também a mesma cultivar apresenta nomes diferentes em cada região, esta informação deve ser usada com reserva.

Algumas das amostras apresentam-se retalhadas e, dependendo de cada produtor, temperadas com variadas ervas aromáticas ou apenas com a salmoura (água e sal).

As amostras foram conservadas na salmoura de acondicionamento para as primeiras análises (parâmetros biométricos). Após a avaliação dos parâmetros biométricos do fruto as amostras foram descaroçadas para se proceder às avaliações no endocarpo. A polpa resultante foi congelada a -20 °C para posteriores determinações.

Na polpa procedeu-se a determinações do teor de humidade, cinzas, gordura e proteínas, sendo que a partir da gordura extraída ainda foi também determinado o perfil em ácidos gordos e tocoferóis.

No que respeita à análise microbiológica, foram recolhidas 8 amostras em fase final de fermentação, provenientes diretamente de 3 produtores, das regiões de Mirandela e Valpaços. Foram colocadas em frascos esterilizados, em condições de assepsia, e transportadas para o laboratório em mala térmica, a uma temperatura de 4 °C.

Tabela 2. Caracterização das amostras em estudo.

Amostras	Origem geográfica	Tipo de Azeitonas	Ano de colheita	Cultivares
1	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas pretas	2008/2009	Cobrançosa
2	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas verdes	2008/2009	Cobrançosa
3	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas mistas	2009/2010	Cobrançosa
4	Mirandela	Azeitonas verdes	2009/2010	Cobrançosa
5	Mirandela	Azeitonas mistas	2009/2010	Cobrançosa
6	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas mistas retalhadas	2009/2010	Cobrançosa
7	Lilela, Valpaços	Azeitonas verdes	2009/2010	Cobrançosa
8	Mirandela	Azeitonas verdes	2009/2010	Cobrançosa
9	Valverde, Valpaços	Azeitonas mistas	2009/2010	Cobrançosa
10	Lilela, Valpaços	Azeitonas verdes	2010/2011	Cobrançosa
11	Lilela, Valpaços	Azeitonas mistas retalhadas	2010/2011	Cobrançosa
12	Valverde, Valpaços	Azeitonas verdes	2009/2010	Cobrançosa
13	Valverde, Valpaços	Azeitonas mistas	2009/2010	Cobrançosa
14	Suçães, Mirandela	Azeitonas mistas	2009/2010	Cobrançosa
15	Lilela, Valpaços	Azeitonas verdes retalhadas	2010/2011	Negrinha de Freixo
16	Mirandela	Azeitonas mistas	2010/2011	Cobrançosa
17	Mós, Moncorvo	Azeitonas verdes	2009/2010	Negrinha de Freixo
18	Mós, Moncorvo	Azeitonas verdes	2008/2009	Negrinha de Freixo
19	Valverde, Valpaços	Azeitonas mistas	2010/2011	Cobrançosa
20	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas pretas	2010/2011	Cobrançosa
21	Mirandela	Azeitonas verdes	2010/2011	Cobrançosa



Figura 4. Exemplo de azeitonas pretas, mistas e verdes, provenientes de algumas das amostras em estudo.

3.2. Parâmetros morfológicos

Os parâmetros morfológicos avaliados basearam-se na caracterização dos parâmetros biométricos do fruto e do endocarpo, de todas as amostras em estudo, e posteriormente na caracterização da relação polpa/caroço.

3.2.1. Parâmetros Biométricos

A caracterização dos frutos e endocarpos realizou-se através de medições e observações de 50 frutos e respetivo endocarpo para cada uma das amostras.

As avaliações incidiram em 11 parâmetros, para o caso do fruto, e em 14 parâmetros, para o caso do endocarpo. Os parâmetros avaliados, quer no fruto quer no endocarpo, encontram-se descritos na Tabela 3, e na Figura 5 exemplifica-se parte de uma amostra de frutos e endocarpos e a medição dos frutos com a craveira.

A escolha dos frutos para observação foi feita aleatoriamente.



Figura 5. Exemplo de amostra de frutos e respetivos endocarpos onde foram avaliados os parâmetros biométricos (amostra 19) e exemplo de medição de um fruto com a craveira.

Em alguns dos parâmetros como é o exemplo da simetria no endocarpo, a avaliação é feita sob 2 eixos. A posição A foi considerada aquela em que o endocarpo apresenta uma maior simetria ao pegá-lo pelos extremos entre os dedos indicador e polegar e a posição B resulta de girar 90° da posição anterior. No caso do fruto a simetria foi apenas avaliada na posição A, seguindo a mesma regra.

Nas avaliações efetuadas, é de salientar a observação e registo dos defeitos, que foram registados de acordo com o “Trade Standard Applying to Table Olives” (COI, 2004) e as normas do *Codex Alimentarius* (2010). Este aspeto é particularmente importante uma vez que entra na sua classificação comercial.

Tabela 3. Parâmetros biométricos avaliados no fruto e no endocarpo (Adaptado de COI, 1997).

Fruto	Endocarpo
Comprimento do fruto (mm)	Comprimento do fruto (mm)
Diâmetro máximo do fruto D (mm)	Diâmetro máximo do fruto D (mm)
Diâmetro mínimo do fruto d (mm)	Diâmetro mínimo do fruto d (mm)
Peso	Peso
Baixo (< 2g)	Baixo (<0,3g)
Médio (2 - 4g)	Médio (0,3 - 0,45g)
Alto (4 - 6g)	Alto (0,454 - 0,7g)
Muito alto (> 6g)	Muito alto (> 0,7g)
Forma (na posição A): determina-se em função do comprimento (C) e largura (L)	Forma (na posição A): determina-se em função do comprimento (C) e largura (L)
Esférica ($C/L < 1,25$)	Esférica ($C/L < 1,4$)
Ovóide ($C/L = 1,25 - 1,45$)	Ovóide ($C/L = 1,4 - 1,8$)
Alongada ($C/L > 1,45$)	Elíptica ($C/L = 1,8 - 2,2$)
	Alongada ($C/L > 1,45$)
Simetria (na posição A)	Simetria (na posição A)
Simétricos	Simétricos
Ligeiramente assimétrico	Ligeiramente assimétrico
Assimétrico	Assimétrico
	Simetria (na posição B)
	Simétricos
	Ligeiramente assimétrico
Posição no diâmetro transversal máximo (na posição B)	Posição no diâmetro transversal máximo (na posição B)
Junto à base	Junto à base
Central	Central
Junto ao ápice	Junto ao ápice
Ápice (na posição A)	Ápice (na posição A)
Pontiagudo	Pontiagudo
Arredondado	Arredondado
Base	Base
Truncada	Truncada
Arredondada	Pontiaguda
	Arredondada
Mamilo	Superfície (na posição B)
Evidente	Lisa
Pouco evidente	Rugosa
Ausente	Muito rugosa
Defeitos	Número de sulcos fibrovasculares
Matérias estranhas	Reduzido (< 7)
Frutos manchados	Médio (7 - 10)
Frutos mutilados	Elevado (> 10)
Frutos quebrados	Distribuição de sulcos fibrovasculares
Frutos enrugados	Uniforme
Textura anormal	Agrupados na proximidade da sutura
Coloração anormal	Extremidade do ápice
Pedúnculos	Sem mucrão
	Com mucrão a partir da base

3.2.2. Relação polpa/caroço

A relação polpa caroço é um parâmetro importante tendo em conta que permite verificar a quantidade de polpa em relação à quantidade de caroço, sendo o mais desejável ter azeitonas com muita polpa e pouco caroço.

De modo a estabelecer a relação polpa/caroço usaram-se os pesos dos frutos e endocarpos obtidos na avaliação dos parâmetros biométricos. Pela diferença entre o peso da polpa e do endocarpo obteve-se o valor da polpa de cada fruto. A relação polpa/caroço obteve-se pela divisão do peso da polpa pelo peso do respetivo caroço.

3.3. Parâmetros físico-químicos

Todas as amostras foram avaliadas em duplicado em todos os parâmetros físico-químicos.

3.3.1. Humidade

A humidade foi determinada através do método AOAC 925.40 (AOAC 1995), pesando aproximadamente 5 g de polpa de azeitona para uma placa de Petri, previamente desidratada e pesada, e colocando-o numa estufa a 100 ± 2 °C. Posteriormente realizam-se pesagens sucessivas até ao seu peso estabilizar.

Os resultados são expressos em percentagem (%).

3.3.2. Cinzas

O teor em cinzas foi determinado por incineração a seco de cerca de 0,5 g de polpa, numa mufla a 550 ± 15 °C, até se obter uma cor branca (AOAC 2000).

Os resultados são expressos em percentagem (%).

3.3.3. Proteínas

O conteúdo em proteína bruta foi estimado segundo o método Kjeldahl (AOAC 2000). Pesou-se 1 g de amostra para tubo de Kjeldahl, de seguida adicionou-se uma pastilha de catalisador (Kjetabs Cx com a composição de 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre II) e 15 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4 concentrado).

Posteriormente procedeu-se à digestão num Bloco digestor a uma temperatura de 400 ± 50 °C, até digestão completa das amostras. Deixaram arrefecer-se as amostras e levaram-se ao sistema de destilação/titulação de Kjeldahl (Velp Scientifica UDK 152), obtendo-se assim os valores percentuais de azoto, convertidos em proteína bruta pelo fator universal (6,25).

Os resultados vêm expressos em percentagem (%) de proteína bruta.

3.3.4. Gordura

De modo a quantificar o teor em gordura pesaram-se rigorosamente 5 g de polpa de azeitona para um almofariz, onde se macerou a amostra juntamente com sulfato de sódio anidro para retirar a humidade e transferiu-se para um cartucho de papel.

A determinação foi realizada em dispositivo de Soxhlet, de acordo com o método AOAC 948.22, usando éter de petróleo ($40 - 60$ °C) como solvente extrator e um tempo mínimo de extração de 24 horas.

Após a extração e recolha do solvente os balões foram colocados numa estufa (100 ± 2 °C) e foram feitas pesagens até ao peso estabilizar.

Os resultados são expressos em percentagem (%).

3.3.5. Hidratos de Carbono

O teor em Hidratos de Carbono, que inclui as fibras, foi estimado após a determinação das percentagens de humidade, proteína bruta, gordura e cinzas, a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hidratos de Carbono} = 100 - (\% \text{ Humidade} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Gordura})$$

3.3.6. Valor Energético

O valor energético das azeitonas foi expresso em quilocalorias (kcal) e estimado após a determinação da proteína bruta, hidratos de carbono e gordura, usando os fatores de Atwater pela seguinte fórmula:

$$\text{Valor Energético} = 4 \times (\text{g Hidratos de carbono} + \text{g Proteína}) + 9 \times (\text{g Gordura})$$

3.3.7. Composição em Ácidos Gordos

Para a análise dos ácidos gordos procedeu-se à extração da gordura de cada amostra, preparando cartuchos, em duplicado, com cerca de 6 g de polpa e sulfato de sódio anidro. A extração realizou-se em dispositivos de Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente e um tempo de extração de 2 horas. Ao solvente foi adicionado 0,01% de BHT para a preservação das amostras.

O solvente extrator foi recolhido, sem levar o extrato à secura, e o excesso de éter foi eliminado num evaporador de azoto. Para preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos procedeu-se a uma transesterificação alcalina a frio, conforme consta no Regulamento 2568/91. Colocaram-se 2 ml de n-heptano num *vial* de 4 ml, adicionaram-se 50 µl de extrato lipídico e agitou-se para homogeneizar a solução. Adicionaram-se 200 µl de solução de KOH 2M em metanol, agitou-se durante cerca de 1 minuto e deixou-se repousar até que a fase superior ficasse límpida. Transferiu-se cerca de 1 ml da fase orgânica para um vial adaptável ao injetor automático do cromatógrafo gasoso (GC).

O perfil em ácidos gordos foi analisado num cromatógrafo gasoso com injetor automático e deteção por ionização em chama (GC/FID). Foi utilizada uma coluna capilar CP-Sil- 88 de 50 m de comprimento, 0,25 µm de diâmetro interno e 0,19 µm de espessura de filme (Varian). Para uma separação efetiva dos diversos ácidos gordos utilizou-se inicialmente uma temperatura de 140 °C, com aumentos de 5 °C/min até 220 °C, sempre a uma pressão constante de 110 kPa de hélio.

A identificação dos ácidos gordos e cálculo dos fatores de correção foi feita com uma mistura padrão (Supelco 37 – Fame Mix) e a quantificação por percentagem relativa das áreas cromatográficas.

3.3.8. Composição em Tocoferóis

A preparação das amostras para a análise dos tocoferóis foi semelhante à utilizada para os ácidos gordos, tendo sido usadas as mesmas extrações de gordura para ambas as análises, em duplicado.

A partir das amostras homogeneizadas foi pesada rigorosamente, para eppendorf, uma quantidade equivalente a duas gotas (cerca de 30 mg). Adicionou-se 20 µl da solução de padrão interno (PI) (tocol, 1,0 mg/10 ml, preparada em hexano) e completou-se o volume a 1 ml com hexano. Após homogeneização os resíduos insolúveis foram

depositados por centrifugação a 13000 rpm, durante 3 minutos. Transferiu-se cerca de 800 µl para um tubo de vidro do injetor automático.

As amostras foram analisadas recorrendo ao sistema de HPLC, que era composto por um injetor automático (AS-950), uma bomba (PU-980) e um detetor de fluorescência (FP-920), programado para 290/330 nm (ganho 10), todo da Jasco (Japão). Os dados cromatográficos foram analisados pelo software ChromNAV Control Center - JASCO Chromatography Data Station. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Supelcosil™ LC-SI (3 µm) 75 × 3,0 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), com uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2), em isocrático, a 0,7 ml/min.

A quantificação foi feita com base nas áreas cromatográficas de cada composto, dividida pela área do PI, recorrendo a curvas de calibração para todos os compostos em estudo. As soluções mãe dos padrões de tocoferóis foram previamente aferidas por medição no UV com base nos seus coeficientes de absorvidade molar característicos (Nesaretnam et al., 2007).

Os resultados foram expressos em mg/100 g de polpa de azeitona.

3.4. Análise estatística

Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada usando o software SPSS, versão 17.0 (SPSS, Inc.), com o objetivo de reduzir o número de variáveis (peso, comprimento, $D_{máx}$, D_{min} , forma, composição química, ácidos gordos e tocoferóis) a um número inferior de novas variáveis derivadas. Além disso, a ACP permite reconhecer padrões nos dados colocando-os num espaço multidimensional, usando para esse feito as novas variáveis derivadas como dimensões.

O objetivo da ACP é produzir componentes capazes de serem usadas como predições ou variáveis de resposta em análises subsequentes. O número de fatores a manter no tratamento dos dados foi avaliado pelo “Screenplot”, tomando em consideração os “eigenvalues” e a consistência interna através do valor do α de Cronbach’s (Rencher, 1995).

3.5. Parâmetros microbiológicos

Os parâmetros microbiológicos foram avaliados na polpa e na salmoura de oito amostras de azeitonas de mesa na fase final de fermentação, com o objetivo de verificar a qualidade e segurança microbiológica das azeitonas de mesa. Os microrganismos pesquisados e/ou quantificados foram os seguintes: microrganismos aeróbios mesófilos, leveduras, coliformes totais, *E. coli*, esporos de clostrídios sulfito redutores, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp..

3.5.1. Preparação de amostras

As amostras recolhidas e conservadas a 4 °C em frascos assépticos foram subdivididas em 2 sub-amostras, através da medição de 25 ml da solução de salmoura e da pesagem de 25 g de polpa de azeitona. Após homogeneização das mesmas em 225 ml de água peptonada, efetuaram-se diluições decimais sucessivas em 9 ml da mesma solução, seguida de inoculação em meios de cultura apropriados para cada microrganismo pesquisado.

Todas as amostras foram analisadas em duplicado e os resultados expressos em unidades formadoras de colónias (UFC) por ml ou g, dependendo do tipo de amostra.

3.5.2. Microrganismos pesquisados e/ou quantificados

3.5.2.1. Contagem total de microrganismos

Placas de Petri com meio de cultura Plate Count Agar (PCA) foram inoculadas com 1mL de cada uma das diluições, utilizando o método de contagem em placa por incorporação do inóculo, de acordo com a norma ISO 4833:2003. Após incubação durante 48 horas a 35 °C procedeu-se à contagem de colónias presentes em cada placa.

3.5.2.2. Leveduras

A contagem de leveduras foi efetuada em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) com adição de 100 mg/L de cloranfenicol (OXOID, Cambridge, UK) de modo a impedir o crescimento de bactérias. A sementeira efetuou-se por incorporação de 1 ml de cada

diluição decimal. Após incubação durante 3 a 5 dias a 25 °C, procedeu-se à contagem das colónias.

3.5.2.3. Coliformes totais e *Escherichia coli*

A pesquisa destes microrganismos foi feita com recurso ao método SimPlate[®], método oficial AOAC 2005.03. Após preparação da amostra, procedeu-se à inoculação das placas SimPlate com 1 ml de amostra e 9 ml de meio de cultura. Após incubação das placas a 37 °C durante 24 a 28 horas, procedeu-se à observação das mesmas de modo a verificar a existência de resultados positivos, o que implica a mudança de cor (rosa – coliformes totais e azul fluorescente sob luz UV a 365 nm – *E. coli*).

Através da utilização da tabela de conversão SimPlate[®] expressaram-se os resultados em UFC/ml ou g de amostra.

3.5.2.4. *Staphylococcus aureus*

Placas de Petri com meio de cultura *Baird Parker* (BP) previamente autoclavado e posteriormente enriquecido com solução de gema de ovo com telurito, foram utilizadas para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, de acordo com a norma NP 4400-1:2002. Após sementeira e espalhamento à superfície de 0,1 ml de cada diluição, as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Foram consideradas colónias características as negras, convexas, brilhantes de diâmetro compreendido entre 1 e 2,5 mm de diâmetro, rodeadas de um halo transparente. As colónias características e não características foram posteriormente repicadas em meio BHI e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após este tempo, as mesmas foram confirmadas por incubação num tubo de ensaio com 1 ml de meio BHI e de 3 ml de plasma de coelho a 37 °C durante 4 a 6 horas.

3.5.2.5. *Salmonella* spp.

A pesquisa deste microrganismo foi feita com recurso a um *kit* rápido, 1-2 Test (método oficial AOAC 989.13), da Biocontrol[®], seguindo-se as instruções do fabricante. Após o período de incubação durante 24 horas a 35-37 °C observou-se a presença de uma banda branca em forma de U indicativo da presença de *Salmonella*.

3.2.5.6. Esporos de Clostrídios sulfito-redutores

Para a pesquisa e quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores foi utilizado o meio de cultura Sulfito-Ferro usando o método de incorporação do inoculo em tubos, de acordo com a NP - 2262 (1986). A inoculação foi efetuada após aquecimento da solução-mãe e diluições em série, em banho-maria a 75 °C, durante 15 minutos, para inativação das formas vegetativas. Após esta fase, incubaram-se os tubos durante 48 h a 37 °C e considerou-se como resultado positivo o aparecimento de colônias negras.

3.5.3. Identificação de Leveduras

Após contagem das leveduras nas placas com meio PDA com adição de 100 mg/L de cloranfenicol, selecionaram-se algumas colônias isoladas e repicaram-se para placas com meio PDA, para obtenção de culturas puras. Após 2 dias de incubação a 25 °C foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos isolados, de forma a verificar se se tratavam de leveduras e se eram culturas puras. As características macroscópicas observadas foram: cor, brilho, forma, margem, superfície, elevação e consistência, de acordo com a metodologia de Yarrow (1998). Na observação das características microscópicas teve-se em conta a forma, tamanho, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada e tipo de gemulação.

Os isolados foram identificados através de galerias API 20C AUX (BioMérieux) e por sequenciação parcial da região D1-D2 do gene 26S rDNA. As sequências obtidas compararam-se entre si e com as existentes na base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e com sequências de estirpes tipo de coleções de culturas diferentes. A sequenciação do rDNA foi feita num laboratório externo de biologia molecular.

3.5.4. Avaliação qualitativa da atividade enzimática de leveduras

A atividade enzimática foi avaliada na maioria das leveduras identificadas. Nestas leveduras foi efetuado um *screening*, através de métodos qualitativos, para a presença das seguintes enzimas: catalase, protease, β -glucosidase, amilase, esterase e lipase.

Todos os testes foram realizados em triplicado, para cada uma das amostras analisadas, e os resultados expressos de forma qualitativa como: “-“ (nenhuma atividade), “+” (fraca atividade), “++” (moderada atividade) e “+++” (forte atividade).

3.5.4.1. Catalase

A atividade da catalase foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Whittenbury (1964), através da adição direta de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) nas colónias de leveduras

A atividade da catálase foi evidenciada através da formação de bolhas e os resultados expressos em termos de ausência (au.) ou presença (pr.).

3.5.4.2. Protease

A produção de proteases extracelulares foi determinada de acordo com o método de Strauss *et al.* (2001), através do espalhamento do inóculo em placas contendo o meio PDA com 20 g/L de caseína, seguido de um período de incubação de 5 dias a 30 °C.

Considerou-se resultado positivo a presença de uma zona clara em torno da colónia.

3.5.4.3. β -Glucosidase

A atividade β -glucosidase das leveduras foi avaliada de acordo com o método descrito por Bautista-Gallego *et al.* (2011) usando 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco), suplementado com 5 g/L de arbutina e 20 g/L de agar e ajustado para pH 5,0 com 0,1 N de HCl. Após autoclavar o meio de cultura adicionou-se 2 ml de solução de citrato férrico amoniacal (1%), por 100 ml de meio fundido. Posteriormente verteu-se o meio em placas de Petri, que foram inoculadas em estrias radiais e incubadas a 25 °C durante 8 dias.

As estirpes com atividade da β -glucosidase são capazes de hidrolisar o substrato e produzir uma cor castanha escura à volta das colónias.

3.5.4.4. Amilase

A pesquisa desta enzima foi efetuada recorrendo ao meio de cultura com a seguinte composição: 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 2 g de amido e 15 g de agar, em 1000 ml de água destilada, e a pH 6,8. Após autoclavar o meio distribuiu-se em placas de Petri, que foram inoculadas com as leveduras, utilizando a técnica de riscado.

Após o período de incubação, de 5 dias à temperatura de 37 °C, foi adicionada solução de Lugol a cada placa e a leitura foi realizada em seguida. Considerou-se uma reação enzimática positiva a formação de um halo de cor castanho em torno das colónias.

3.5.4.5. Esterase

A identificação da atividade da esterase foi realizada usando o meio Agar base tributirina. O meio foi esterilizado, colocado em placas de Petri e as leveduras inoculadas pela técnica de riscado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas.

O aparecimento de um halo translúcido à volta da colónia indica uma reação positiva.

3.5.4.6. Lipase

A pesquisa da atividade lipase foi efetuada usando o meio Agar base tributirina, ao qual foi adicionado azeite, numa proporção de 1 ml/100 ml de meio, baseado na metodologia descrita por Gupta *et al.* (2003).

As leveduras foram inoculadas pela técnica de riscado e as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas.

Considerou-se um resultado positivo o aparecimento de um halo translúcido à volta da colónia.

4.1. Parâmetros morfológicos

4.1.1. Parâmetros biométricos nos frutos

Na tabela 4 apresentam-se os resultados relativos à determinação dos parâmetros biométricos no fruto, referindo os valores médios e respectivos desvios padrões das amostras em estudo, e na Figura 6 exemplifica-se essa determinação em algumas amostras.

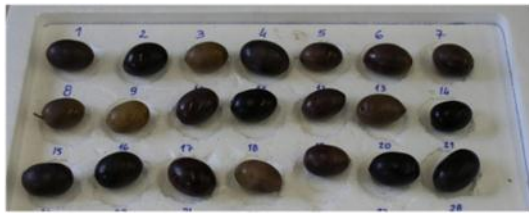
No que respeita ao comprimento dos frutos, a amostra 1 foi a que apresentou frutos mais compridos, com um valor médio de 24,93 mm, seguida da amostra 20 com 24,45 mm. Por oposição, a amostra 7 que é a que apresenta valores mais baixos, com 20,00 mm.

No que respeita ao diâmetro máximos dos frutos, a amostra 20 é a que se destaca apresentando frutos com um diâmetro máximo médio de 18,15 mm, seguindo-se as amostras 17 e 1, com valores de 17,68 e 17,63 mm, respetivamente. A amostra 7 foi mais uma vez a que apresentou valores inferiores, com 14,17 mm.

À semelhança dos resultados obtidos para o diâmetro máximo, a amostra 20 é a que apresenta um diâmetro mínimo superior, com 13,99 mm, e a amostra 7 a que tem frutos com menor diâmetro mínimo, tendo um valor médio de 10,66 mm, seguindo-se a amostra 2, com 10,94 mm.

No que respeita à massa dos frutos, a amostra 20 tem proporcionalmente os frutos mais pesados, com 4,88 g, seguindo-se a amostra 1, com 4,86 g. A amostra 7 é a que apresenta frutos com peso mais baixo, distanciando-se bastante dos pesos das restantes amostras, com um valor médio de 2,35 g.

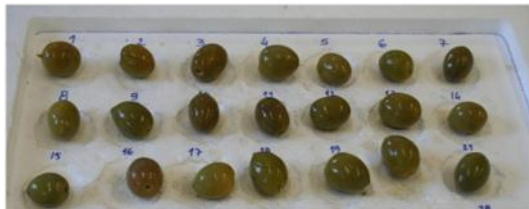
É de salientar que a amostra 7 é a que apresenta frutos com valores inferiores em todos os parâmetros mencionados anteriormente, e a amostra 20 a que apresenta valores superiores, excetuando o comprimento do fruto onde é a segunda mais comprida.



Amostra 1



Amostra 5



Amostra 15



Amostra 19

Figura 6. Avaliação dos parâmetros biométricos nos frutos de algumas das amostras em estudo.

Quanto à forma, esta pode ser esférica ($C/L < 1,25$), ovóide ($C/L = 1,25 - 1,45$) ou alongada ($C/L > 1,45$), tendo em atenção os parâmetros mencionados na Tabela 2.

Verificou-se que todas as amostras têm forma ovóide, não existindo nenhuma com forma esférica ou alongada. Neste caso a amostra 21 é a que apresenta valores mais próximos do limite inferior, com 1,25, e a amostra 2 a que apresenta valores mais próximos do limite superior, com 1,44.

Na tabela 5 são visíveis os restantes parâmetros biométricos avaliados no fruto.

Em termos de simetria dos frutos, a maioria das amostras apresentam frutos ligeiramente assimétricos, com exceção das amostras 11, 13, 19 e 20 que têm frutos maioritariamente simétricos. A amostra 5 é uma destaca-se relativamente às restantes, pois apresenta uma percentagem de ocorrência igual para frutos simétricos e ligeiramente assimétricos, ambos com 48%.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de parâmetros biométricos avaliados no fruto.

Amostra	Comprimento (mm)	Dmáx. (mm)	Dmin. (mm)	Peso (g)	Forma (C/L)
1	24,93 ± 2,22	17,63 ± 1,41	13,18 ± 1,41	4,86 ± 0,96	1,41 ± 0,07
2	21,70 ± 1,41	15,04 ± 0,97	10,94 ± 0,98	3,07 ± 0,58	1,44 ± 0,07
3	23,27 ± 1,33	17,19 ± 0,79	12,52 ± 0,89	4,32 ± 0,56	1,35 ± 0,07
4	22,59 ± 1,50	17,04 ± 0,85	12,78 ± 0,89	3,90 ± 0,49	1,33 ± 0,08
5	22,72 ± 1,26	16,95 ± 0,98	12,47 ± 0,70	3,98 ± 0,51	1,34 ± 0,08
6	22,77 ± 1,97	16,17 ± 1,02	12,26 ± 0,77	3,82 ± 0,66	1,41 ± 0,10
7	20,00 ± 1,32	14,17 ± 0,74	10,66 ± 0,62	2,35 ± 0,36	1,41 ± 0,08
8	22,96 ± 1,60	16,12 ± 0,87	12,30 ± 0,77	3,60 ± 0,61	1,43 ± 0,07
9	23,23 ± 1,39	17,24 ± 0,95	13,19 ± 1,21	4,24 ± 0,68	1,35 ± 0,07
10	22,84 ± 1,97	16,56 ± 1,17	13,01 ± 1,22	3,82 ± 0,82	1,38 ± 0,08
11	22,86 ± 1,83	16,27 ± 1,08	12,54 ± 1,05	3,71 ± 0,72	1,41 ± 0,08
12	23,47 ± 1,74	16,87 ± 1,02	13,10 ± 1,06	4,17 ± 0,62	1,39 ± 0,09
13	23,04 ± 1,66	16,60 ± 0,98	12,90 ± 1,14	4,29 ± 0,61	1,39 ± 0,10
14	22,93 ± 1,62	17,05 ± 1,09	12,48 ± 0,82	4,11 ± 0,65	1,35 ± 0,07
15	22,22 ± 1,62	17,34 ± 1,02	12,63 ± 0,78	3,87 ± 0,66	1,28 ± 0,06
16	20,85 ± 1,37	16,47 ± 1,05	12,30 ± 0,92	3,49 ± 0,59	1,27 ± 0,07
17	23,03 ± 1,68	17,68 ± 1,22	13,09 ± 0,97	4,28 ± 0,77	1,31 ± 0,08
18	20,32 ± 1,31	15,37 ± 0,82	11,70 ± 0,82	3,04 ± 0,53	1,32 ± 0,06
19	21,87 ± 1,34	16,65 ± 0,78	12,35 ± 0,96	3,53 ± 0,47	1,32 ± 0,08
20	24,45 ± 1,84	18,15 ± 1,07	13,99 ± 0,88	4,88 ± 0,84	1,35 ± 0,07
21	21,74 ± 1,90	17,34 ± 1,19	12,60 ± 1,13	3,82 ± 0,78	1,25 ± 0,06
Mínimo	20,00 ± 1,32	14,17 ± 0,74	10,66 ± 0,62	2,35 ± 0,36	1,25 ± 0,06
Máximo	24,93 ± 2,22	18,15 ± 1,07	13,99 ± 0,88	4,88 ± 0,84	1,44 ± 0,07
Média ± dp	22,54 ± 1,15	16,70 ± 0,89	12,53 ± 0,70	3,85 ± 0,55	1,35 ± 0,06

Tabela 5. Características morfológicas do fruto, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo.

Amostra	Simetria			Posição do diâmetro transversal máximo			Ápice		Base		Mamilo		
	Simétrico	Ligeiramente Assimétrico	Assimétrico	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Arredondada	Evidente	Pouco evidente	Ausente
1	20	64	16	12	80	8	64	36	50	50	40	38	22
2	32	64	4	16	70	14	78	22	50	50	72	26	2
3	30	62	8	38	58	4	56	44	54	46	38	32	30
4	40	56	4	40	58	2	78	22	34	66	48	44	8
5	48	48	4	32	64	4	76	24	34	66	46	38	16
6	34	54	12	22	76	2	90	10	34	66	56	38	6
7	22	70	8	42	54	2	74	26	28	72	38	46	16
8	46	52	2	16	78	6	56	44	64	36	44	32	24
9	48	50	2	18	82	0	30	70	50	50	18	44	38
10	30	66	4	26	58	16	74	26	60	40	50	34	16
11	54	46	0	14	76	10	78	22	42	58	38	40	22
12	44	54	2	18	82	0	40	60	58	42	22	44	34
13	72	28	0	10	90	0	46	54	70	30	8	58	34
14	46	50	4	30	68	2	46	54	44	56	14	52	34
15	28	66	6	30	70	0	70	30	32	68	52	28	20
16	34	56	10	28	70	2	44	56	64	36	8	56	36
17	38	60	2	30	68	2	32	68	56	44	18	50	32
18	38	52	10	6	80	14	68	32	40	60	22	60	18
19	74	26	0	6	94	0	48	52	42	58	28	38	34
20	60	40	0	22	70	8	58	42	50	50	24	54	22
21	48	50	2	18	82	0	34	66	60	38	12	30	58

Todas as amostras ostentam uma posição do diâmetro transversal máximo, na posição B, central, sendo a amostra 19 a que tem maior percentagem de ocorrência, com 94%, seguida da amostra 13 com 90%.

Relativamente ao ápice, na sua maioria as amostras apresentam um ápice pontiagudo, no entanto existe uma certa variabilidade nos resultados. A amostra 6 é a que tem uma maior percentagem de ocorrência, com 90% da amostragem com ápice pontiagudo, contrariamente a amostra 9 é a que mostra maior percentagem de ocorrência, tendo 70% com ápice arredondado. Das amostras que apresentam ápice arredondado são de referir, além da amostra 9, as amostras 12, 13, 14, 16, 17, 19 e 21.








Atendendo ao tipo de base ostentada pelos frutos de cada amostra, é de salientar que os resultados são muito aproximados, uma vez que o número de amostras com base truncada (8 amostras) é muito próximo das que apresentam base arredondada (9 amostras). As amostras 1, 2, 9 e 20 exibem um resultado bastante peculiar, pois 50% dos frutos de cada uma destas amostras têm base truncada e os outros 50%, têm base arredondada.

No que respeita ao mamilo, a amostra 21 é a única que apresenta mamilo ausente, sendo que a maioria das amostras têm frutos com mamilo pouco evidente, salientando-se a amostra 18 que é a que tem maior percentagem de ocorrência com 60%. De todas as amostras analisadas, oito apresentam frutos com mamilo evidente, sendo a amostra 2 a que se salienta, com 72% de ocorrência.

De acordo com o “Trade Standard Applying to Table Olives” (COI, 2004) e as normas do *Codex Alimentarius* (2010), devem considerar-se os seguintes defeitos: presença de matéria estranha, frutos manchados, frutos mutilados, frutos quebrados, frutos enrugados, textura anormal, coloração anormal ou presença de pedúnculos.

Na Tabela 6 estão representados os defeitos identificados nas amostras em estudo, tendo sido esta verificação efetuada nos 50 frutos de cada amostra utilizados para a avaliação dos restantes parâmetros biométricos.

Tabela 6. Defeitos encontrados nos frutos das amostras em estudo e sua caracterização.

Defeito	Descrição do defeito
Picada de mosca	
	Frutos que apresentam um orifício característico da picada da mosca da azeitona, <i>Bactrocera oleae</i> Rossi.
Picada de pássaro	
	Frutos que apresentam um orifício característico da picada de um pássaro, sendo este de maior dimensão dos provocados pela mosca.
Orifício de saída	
	Frutos que apresentam um orifício característico da saída da mosca da azeitona, <i>Bactrocera oleae</i> Rossi.
Fruto mutilado	
	Os frutos mutilados caracterizam-se por apresentarem um rompimento do epicarpo, ao ponto de uma parte do mesocarpo se encontrar visível.
Fruto enrugado	
	Os frutos enrugados caracterizam-se por um enrugamento da sua superfície, que altera o seu aspeto normal.
Fruto pisado	
	Os frutos pisados caracterizam-se pela presença de maçaduras desde o epicarpo ao mesocarpo, que alteram o seu aspeto normal.
Fruto manchado	
	Os frutos manchados caracterizam-se por apresentarem marcas superficiais, que penetram ou não a polpa.

Em todas as amostras analisadas, os defeitos mais comuns foram a picada de mosca, o fruto mutilado e o fruto pisado. A presença de orifício de saída ou as picadas de pássaro foram os defeitos com menor ocorrência.

4.1.2. Parâmetros biométricos nos endocarpos

Na Tabela 7 estão representados os resultados da determinação dos parâmetros biométricos nos endocarpos, em termos de média e respetivo desvio padrão, de todas as amostras em estudo, e a Figura 8 exemplifica a avaliação desses parâmetros em algumas das amostras.

Relativamente ao comprimento dos caroços, verifica-se que a amostra 1, que teve frutos mais compridos, é simultaneamente aquela que também apresenta caroços mais compridos, com 18,07 mm, seguida da amostra 20, com 17,69 mm. A amostra 16 é a que tem os frutos mais curtos, com um valor médio de 14,39 mm.

No que respeita ao diâmetro máximo dos endocarpos, tal como nos frutos, a amostra 20 é a que se destaca, com um diâmetro máximo superior de 8,64 mm, seguida da amostra 4 com 8,37 mm. As amostras 21 e 7 são as que apresentam endocarpos com menor diâmetro máximo, tendo valores de 7,60 mm e 7,67 mm, respetivamente.

A amostra 4, seguida da amostra 1, foram as que obtiveram um maior diâmetro mínimo dos seus caroços, com valores médios de 5,98 mm e 5,95 mm, respetivamente. Por outro lado, a amostra 18 foi a que apresentou caroços com um menor diâmetro mínimo, tendo em média 5,16 mm.

Quanto ao peso dos endocarpos, a amostra 20 é a que tem caroços mais pesados, com valor médio de 0,78 g, seguindo-se a amostra 1 com 0,74 g, o que está coincidente com os resultados obtidos para os frutos, tendo estas amostras também os frutos mais pesados. Por sua vez, a amostra 21 é a que apresenta os caroços mais leves, pesando em média 0,50 g, e a amostra 16 com 0,53 g.

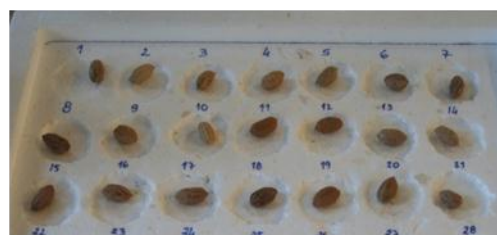
A forma dos caroços é determinada segundo a relação C/L, onde estes podem ter forma esférica ($C/L < 1,4$), ovóide ($C/L = 1,4 - 1,8$), elíptica ($C/L = 1,8 - 2,2$) ou alongada ($C/L > 1,45$). Observando os valores obtidos, verifica-se que os endocarpos de todas as amostras têm forma elíptica, pois o valor mínimo obtido foi de 1,85 para a amostra 15 e o valor máximo foi de 2,19, para a amostra 1.

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de parâmetros biométricos avaliados no endocarpo.

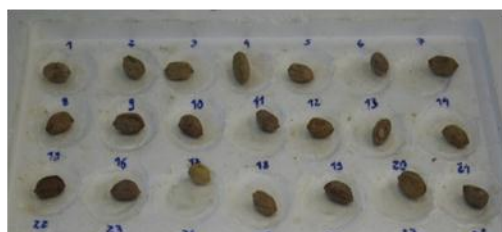
Amostra	Comprimento (mm)	Dmáx. (mm)	Dmin. (mm)	Peso (g)	Forma (C/L)
1	18,07 ± 1,65	8,27 ± 0,67	5,95 ± 0,49	0,74 ± 0,15	2,19 ± 0,17
2	16,45 ± 1,27	8,14 ± 0,66	5,87 ± 0,53	0,63 ± 0,13	2,03 ± 0,15
3	16,88 ± 1,37	8,26 ± 0,44	5,76 ± 0,37	0,68 ± 0,09	2,05 ± 0,17
4	16,20 ± 1,47	8,37 ± 0,65	5,98 ± 0,51	0,69 ± 0,12	1,94 ± 0,22
5	16,24 ± 1,22	8,05 ± 0,47	5,67 ± 0,50	0,62 ± 0,07	2,02 ± 0,19
6	16,93 ± 1,40	8,11 ± 0,62	5,73 ± 0,56	0,67 ± 0,12	2,09 ± 0,16
7	15,17 ± 1,22	7,67 ± 0,60	5,40 ± 0,58	0,56 ± 0,11	1,98 ± 0,16
8	16,85 ± 1,42	7,92 ± 0,56	5,65 ± 0,50	0,64 ± 0,12	2,13 ± 0,17
9	16,50 ± 1,32	8,12 ± 0,71	5,69 ± 0,47	0,67 ± 0,13	2,04 ± 0,19
10	16,36 ± 1,61	8,19 ± 0,78	5,83 ± 0,67	0,67 ± 0,17	2,00 ± 0,16
11	16,79 ± 1,46	7,78 ± 0,64	5,65 ± 0,62	0,60 ± 0,13	2,16 ± 0,17
12	17,18 ± 1,24	7,96 ± 0,54	5,78 ± 0,41	0,70 ± 0,11	2,12 ± 0,31
13	16,79 ± 1,35	7,99 ± 0,63	5,53 ± 0,35	0,68 ± 0,12	2,11 ± 0,18
14	16,49 ± 1,25	8,24 ± 0,52	5,77 ± 0,53	0,70 ± 0,11	2,01 ± 0,17
15	15,18 ± 1,19	8,23 ± 0,62	5,56 ± 0,76	0,62 ± 0,11	1,85 ± 0,18
16	14,39 ± 1,14	7,70 ± 0,39	5,49 ± 0,52	0,53 ± 0,06	1,87 ± 0,17
17	16,10 ± 1,32	8,09 ± 0,52	5,39 ± 0,52	0,63 ± 0,10	1,99 ± 0,15
18	14,67 ± 1,26	7,73 ± 0,61	5,16 ± 0,59	0,53 ± 0,09	1,90 ± 0,14
19	15,59 ± 1,22	7,97 ± 0,49	5,62 ± 0,48	0,58 ± 0,10	1,96 ± 0,14
20	17,69 ± 1,62	8,64 ± 0,77	5,87 ± 0,66	0,78 ± 0,16	2,05 ± 0,18
21	14,57 ± 1,39	7,60 ± 0,46	5,28 ± 0,48	0,50 ± 0,08	1,92 ± 0,20
Mínimo	14,39 ± 1,14	7,60 ± 0,46	5,16 ± 0,59	0,50 ± 0,08	1,85 ± 0,18
Máximo	18,07 ± 1,65	8,64 ± 0,77	5,98 ± 0,51	0,78 ± 0,16	2,19 ± 0,17
Média ± dp	16,18 ± 1,00	8,08 ± 0,28	5,68 ± 0,33	0,64 ± 0,07	2,00 ± 0,10



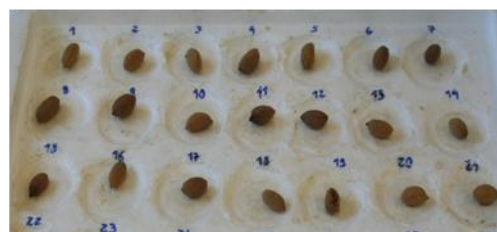
Amostra 1



Amostra 5



Amostra 15



Amostra 19

Figura 7. Avaliação dos parâmetros biométricos nos endocarpos de algumas das amostras em estudo.

Nas Tabelas 8 e 9 estão expostos os restantes resultados relativos à avaliação dos parâmetros biométricos nos endocarpos.

Relativamente à simetria, na posição A, verifica-se que a maioria das amostras tem endocarpos simétricos, o que difere dos resultados respeitantes à simetria na posição B, onde todas as amostras apresentam endocarpos ligeiramente assimétricos, com a exceção da amostra 13 que tem uma percentagem de ocorrência de 50%, para cada hipótese.

A posição do diâmetro transversal máximo nos endocarpos é central para todas as amostras, com a exceção da amostra 21, cujo diâmetro máximo é junto ao ápice.

No que respeita ao ápice, é visível que todas as amostras apresentam um ápice pontiagudo, sendo as amostras 17 e 18 as mais representativas, com 100% de ocorrência, seguidas das amostras 2 e 16, com 96% de ocorrência.

Quanto à base, a maioria das amostras apresenta endocarpos com base pontiaguda, excluindo-se a amostra 15 e 17, que têm base arredondada, não existindo assim nenhuma amostra cujos endocarpos tenham base truncada.

Tabela 8. Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo.

Amostra	Simetria (Posição A)			Simetria (Posição B)		Posição do diâmetro transversal máximo (Posição B)			Ápice (Posição A)			Base	
	Simétrico	Ligeiramente Assimétrico	Assimétrico	Simétrico	Ligeiramente Assimétrico	Junto à base	Central	Junto ao ápice	Pontiagudo	Arredondado	Truncada	Pontiaguda	Arredondada
1	54	42	4	10	90	14	70	16	88	12	28	48	24
2	64	34	2	14	86	14	68	18	96	4	12	72	16
3	50	46	4	10	90	30	40	30	88	12	4	84	12
4	58	40	2	24	76	22	56	22	86	14	16	66	18
5	40	52	8	6	94	26	58	16	86	14	2	80	18
6	58	38	4	10	90	8	76	16	88	12	4	88	8
7	64	30	6	6	94	14	72	14	88	12	4	90	6
8	52	44	4	8	92	12	56	32	90	10	4	78	18
9	48	48	4	16	84	12	80	8	94	6	30	60	10
10	48	52	0	12	88	10	64	26	88	12	16	58	26
11	62	38	0	16	84	8	62	30	94	6	6	80	14
12	66	32	2	18	82	14	74	12	94	6	28	70	2
13	44	56	0	50	50	10	78	12	86	14	6	84	10
14	64	32	4	18	82	14	66	20	88	12	2	92	6
15	60	40	0	12	88	10	72	18	92	8	26	10	64
16	46	52	2	28	72	4	58	38	96	4	50	22	28
17	74	26	0	16	84	0	70	30	100	0	14	32	54
18	64	36	0	10	90	2	46	52	100	0	12	64	24
19	80	18	2	28	72	8	78	14	94	6	12	78	10
20	76	22	2	30	70	20	60	20	90	10	16	50	34
21	86	14	0	20	80	0	42	58	94	6	30	36	34

Tabela 9. Características morfológicas do endocarpo, em percentagem (%) de ocorrência, nas amostras em estudo (continuação da tabela 8).

Amostra	Superfície (Posição B)			Número de sulcos fibrovasculares			Distribuição de sulcos fibrovasculares		Extremidade do Ápice	
	Lisa	Rugosa	Muito rugosa	Reduzido	Médio	Elevado	Uniformes	Agrupados na proximidade da sutura	Sem mucrão	Com mucrão a partir da base
1	0	44	56	16	78	6	90	10	16	84
2	0	74	26	22	74	4	78	22	14	86
3	0	70	30	26	70	4	80	20	12	88
4	0	68	32	30	66	4	80	20	10	90
5	0	66	34	4	90	6	88	12	12	88
6	0	78	22	34	66	0	88	12	14	86
7	0	74	26	28	68	4	86	14	6	94
8	0	76	24	22	76	2	84	16	12	88
9	0	72	28	26	70	4	88	12	8	92
10	0	66	34	28	70	2	88	12	18	82
11	0	76	24	24	70	6	82	18	6	94
12	0	80	20	30	70	0	84	16	4	96
13	0	90	10	28	70	2	74	26	12	88
14	0	80	20	30	68	2	86	14	10	90
15	0	88	12	8	52	40	86	14	8	92
16	0	84	16	10	60	30	76	24	4	96
17	0	94	6	6	48	46	86	14	0	100
18	0	98	2	2	52	46	86	14	0	100
19	0	80	20	0	76	24	88	12	12	88
20	0	6	94	8	82	10	92	8	2	98
21	0	96	4	2	38	60	98	2	4	96

À exceção das amostras 1 e 20, que apresentam uma superfície muito rugosa, as restantes apresentam superfície rugosa, não havendo nenhum registo de endocarpos apresentando uma superfície lisa.

Atendendo ao número de sulcos fibrovasculares, a grande maioria das amostras tem um número de sulcos médio, sendo a exceção a amostra 21 que apresenta um número elevado de sulcos. No entanto, em todas as amostras os sulcos distribuem-se uniformemente.

No que respeita à extremidade do ápice, todas as amostras apresentam, na sua maioria, caroços com mucrão a partir da base, salientando-se as amostras 17 e 18, com 100% de ocorrência, não havendo registos significativos de caroços sem mucrão em qualquer uma das amostras.

4.1.3. Relação polpa/caroço

A relação polpa/caroço é de extrema importância quando relacionada com a produção de azeitonas de mesa. Este parâmetro é essencial de modo a verificarmos a proporção de polpa em relação ao caroço em cada cultivar de azeitona (Sakouhi *et al.*, 2008), tendo em conta que para a preparação de azeitonas de mesa é desejável que as azeitonas tenham muita polpa e pouco caroço, pois a maior valorização é da polpa. Nas azeitonas para produção de azeite, este parâmetro é dispensável, uma vez que a qualidade do azeite depende da qualidade da gordura extraída e não da quantidade de polpa.

Na Tabela 10 estão representados o peso do fruto e respetivo caroço, a quantidade de polpa e a relação polpa/caroço respeitante a cada amostra analisada.

Neste contexto verifica-se que os frutos mais pesados pertencem mais uma vez à amostra 20, com 4,88 g em média, enquanto a amostra 7 é a que apresenta os frutos mais leves. Quanto ao endocarpo, salienta-se que a amostra 20, além dos frutos, também apresenta os caroços mais pesados (0,78 g), no entanto é a amostra 21 que apresenta os endocarpos mais leves, tendo 0,50 g de peso médio.

As amostras 1 e 20 foram as que apresentaram maior teor em polpa, tendo valores muito próximos, com 4,12 g e 4,11 g, respetivamente sendo a amostra 7 a que apresenta valores inferiores, com um teor de polpa médio de 1,79 g.

No que respeita à relação polpa/caroço a amostra 21 foi a que se destacou, apresentando um valor médio mais favorável com 6,72, seguida da amostra 17, com 5,80.

Por outro lado, a amostra 7 é, uma vez mais, a menos propícia tendo um valor médio de 3,30.

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão, em gramas, do fruto, endocarpo, polpa e relação polpa/carão das amostras em estudo.

Amostra	Peso fruto	Peso endocarpo	Polpa	Relação polpa/carão
1	4,86 ± 0,96	0,74 ± 0,15	4,12 ± 0,83	5,60 ± 0,78
2	3,07 ± 0,58	0,63 ± 0,13	2,44 ± 0,47	3,87 ± 0,45
3	4,32 ± 0,56	0,68 ± 0,09	3,64 ± 0,49	5,39 ± 0,52
4	3,90 ± 0,49	0,69 ± 0,12	3,21 ± 0,42	4,74 ± 0,73
5	3,98 ± 0,51	0,62 ± 0,07	3,36 ± 0,45	5,40 ± 0,51
6	3,82 ± 0,66	0,67 ± 0,12	3,15 ± 0,59	4,77 ± 0,79
7	2,35 ± 0,36	0,56 ± 0,11	1,79 ± 0,32	3,30 ± 0,67
8	3,60 ± 0,61	0,64 ± 0,12	2,96 ± 0,51	4,63 ± 0,57
9	4,24 ± 0,68	0,67 ± 0,13	3,57 ± 0,57	5,41 ± 0,60
10	3,82 ± 0,82	0,67 ± 0,17	3,15 ± 0,67	4,76 ± 0,64
11	3,71 ± 0,72	0,60 ± 0,13	3,11 ± 0,62	5,27 ± 0,77
12	4,17 ± 0,62	0,70 ± 0,11	3,47 ± 0,53	4,96 ± 0,57
13	4,29 ± 0,61	0,68 ± 0,12	3,61 ± 0,51	5,31 ± 0,51
14	4,11 ± 0,65	0,70 ± 0,11	3,41 ± 0,56	4,87 ± 0,66
15	3,87 ± 0,66	0,62 ± 0,11	3,25 ± 0,62	5,38 ± 1,11
16	3,49 ± 0,59	0,53 ± 0,06	2,96 ± 0,54	5,62 ± 0,68
17	4,28 ± 0,77	0,63 ± 0,10	3,65 ± 0,70	5,80 ± 0,76
18	3,04 ± 0,53	0,53 ± 0,09	2,52 ± 0,46	4,80 ± 0,58
19	3,53 ± 0,47	0,58 ± 0,10	2,96 ± 0,41	5,20 ± 0,86
20	4,88 ± 0,84	0,78 ± 0,16	4,11 ± 0,70	5,40 ± 0,78
21	3,82 ± 0,78	0,50 ± 0,08	3,32 ± 0,73	6,72 ± 1,31
Mínimo	2,35 ± 0,36	0,50 ± 0,08	1,79 ± 0,32	3,30 ± 0,67
Máximo	4,88 ± 0,84	0,78 ± 0,16	4,12 ± 0,83	6,72 ± 1,31
Média ± dp	3,86 ± 0,59	0,64 ± 0,07	3,23 ± 0,54	5,05 ± 0,69

4.2. Parâmetros físico-químicos

4.2.1. Composição química

De modo a caracterizar quimicamente as amostras em estudo, foi determinado o teor em humidade, cinzas, proteína bruta e gordura bruta. Foi também estimado o teor em hidratos de carbono e o valor energético. Os resultados estão expressos em percentagem e encontram-se detalhados na Tabela 11.

A água é o componente maioritário na composição das azeitonas de mesa, sendo o valor máximo obtido de 78,4% para a amostra 21. Este valor distancia-se do valor mínimo que foi observado na amostra 13 (62,9%). Os resultados obtidos no presente trabalho são superiores aos indicados por Cardoso *et al.* (2010) para azeitonas de mesa de fermentação natural, processadas com azeitonas de Cv. Taggiasca, onde foi obtido o valor de 46,7% de humidade. Por outro lado, são aproximados aos obtidos por Sousa *et al.* (2011), que obteve valores médios de 72,5%, e por Malheiro *et al.* (2012), com valores entre 70,1% e 75,7%, sendo os resultados de ambos referentes a “*alcaparras*”.

Depois da humidade, a gordura é o segundo componente mais abundante nas azeitonas, com valores obtidos entre 10,2% e 26,6%, para a amostra 15 e 14, respetivamente. A variabilidade dos valores pode estar relacionada principalmente com a cultivar, que é regulada por fatores genéticos (Malheiro *et al.*, 2012), não tendo, no entanto, relação com o método de processamento nem com o armazenamento das azeitonas (Ünal & Nergiz, 2003).

No que respeita ao teor em proteína bruta obtido, verifica-se que varia entre 2,9% e 4,6%, sendo uma vez mais o valor superior pertencente à amostra 21 e o valor inferior referente à amostra 5. Estes valores são superiores aos reportados por Malheiro *et al.* (2012) relativamente a “*alcaparras*”, que variaram entre 0,6% e 1,4%, e que os valores reportados por Ünal & Nergiz (2003) que oscilaram entre 1,09% e 1,58%, para azeitonas pretas ao natural. A variabilidade de valores da proteína bruta pode estar relacionada com o método de processamento utilizado (Ünal & Nergiz, 2003), bem como com a quantidade de humidade presente na amostra (Sousa *et al.*, 2011).

Os valores das cinzas obtidos são muito díspares entre as amostras, sendo o valor mais baixo pertencente à amostra 21 (0,33%) e o valor superior, de 7,08% pertencente à amostra 18. Este inclui os sais naturalmente presentes na azeitona e os decorrentes da adição da salmoura. Estes valores estão de acordo com os obtidos por Sousa *et al.* (2011)

relativamente às “*alcaparras*”, onde este também é o parâmetro que apresenta maior disparidade de resultados. É de referir que o teor em cinzas aumenta durante a fermentação e o processo de amadurecimento, e que teores de cinzas reduzidos implicam um baixo teor de sal, o que é nutricionalmente mais adequado (Malheiro *et al.*, 2012).

A Figura 8 representa um exemplo de cinzas obtidas em algumas amostras em estudo.



Figura 8. Exemplo de cinzas obtidas da Amostra 10 e 8.

Tabela 11. Composição química aproximada das amostras em estudo, valores médios e desvio padrão, em percentagem (%).

Amostras	Humidade (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)	Proteínas (%)	Hidratos de Carbono (%)	Valor Energético (Kcal)
1	65,1 ± 0,82	3,58 ± 0,34	24,7 ± 1,31	3,3 ± 0,37	3,3 ± 1,42	249 ± 4,61
2	64,7 ± 0,11	5,55 ± 0,06	18,6 ± 0,26	3,1 ± 0,03	8,0 ± 0,28	212 ± 1,07
3	67,2 ± 0,32	5,60 ± 0,58	22,6 ± 1,53	3,2 ± 0,02	1,3 ± 0,65	222 ± 11,27
4	64,7 ± 0,23	5,18 ± 0,32	20,2 ± 1,35	3,4 ± 0,09	6,6 ± 1,35	222 ± 7,14
5	65,1 ± 1,30	6,76 ± 0,05	24,3 ± 0,66	2,9 ± 0,04	0,9 ± 0,72	234 ± 8,73
6	67,7 ± 0,35	5,83 ± 0,13	20,7 ± 3,02	3,6 ± 0,12	2,2 ± 2,92	209 ± 15,99
7	67,0 ± 0,52	4,89 ± 0,72	19,4 ± 1,30	3,8 ± 0,06	4,9 ± 2,48	210 ± 1,56
8	65,4 ± 0,01	6,08 ± 0,05	21,2 ± 1,41	3,5 ± 0,08	3,8 ± 1,26	220 ± 7,27
9	65,5 ± 0,17	5,25 ± 0,09	24,0 ± 0,70	3,3 ± 0,04	1,9 ± 0,65	237 ± 3,84
10	72,4 ± 0,07	3,13 ± 0,08	15,8 ± 0,23	4,1 ± 0,10	4,6 ± 0,18	177 ± 1,73
11	73,3 ± 0,13	5,25 ± 0,00	17,9 ± 1,15	4,0 ± 0,03	-0,5 ± 1,25	176 ± 5,19
12	70,8 ± 0,12	2,87 ± 0,01	22,0 ± 1,04	4,2 ± 0,04	0,2 ± 0,87	215 ± 5,68
13	62,9 ± 0,26	6,46 ± 0,19	24,8 ± 0,12	4,2 ± 0,12	1,7 ± 0,31	246 ± 0,28
14	64,8 ± 0,15	1,78 ± 0,08	26,6 ± 2,01	4,5 ± 0,12	2,3 ± 2,06	267 ± 10,31
15	73,4 ± 0,16	6,43 ± 0,12	10,2 ± 1,27	4,4 ± 0,01	5,5 ± 1,00	132 ± 7,44
16	70,8 ± 0,26	4,91 ± 0,19	18,0 ± 0,87	3,6 ± 0,01	2,6 ± 0,42	187 ± 6,15
17	76,7 ± 0,44	0,46 ± 0,05	14,1 ± 0,20	5,3 ± 0,04	3,4 ± 0,65	162 ± 0,99
18	70,1 ± 0,24	7,08 ± 0,14	14,1 ± 1,10	3,8 ± 0,01	4,9 ± 1,20	162 ± 5,08
19	69,2 ± 0,10	5,17 ± 0,10	18,9 ± 2,16	4,1 ± 0,09	2,6 ± 2,07	197 ± 10,82
20	70,8 ± 0,43	0,45 ± 0,05	18,9 ± 4,05	4,5 ± 0,04	5,4 ± 3,62	209 ± 22,16
21	78,4 ± 0,22	0,33 ± 0,25	14,9 ± 3,01	4,6 ± 0,08	2,3 ± 2,97	157 ± 14,90
Mínimo	62,9 ± 0,26	0,33 ± 0,25	10,2 ± 1,27	2,9 ± 0,04	0,2 ± 0,87	132 ± 7,44
Máximo	78,4 ± 0,22	7,08 ± 0,14	26,6 ± 2,01	4,6 ± 0,08	8,1 ± 0,28	266 ± 10,31
Média ± dp	69,8 ± 4,29	3,88 ± 0,60	19,6 ± 4,24	4,4 ± 2,13	3,2 ± 2,14	205 ± 34,46

O teor em hidratos de carbono, estimado por diferença dos restantes parâmetros, foi muito variável entre as amostras analisadas, tendo-se registado valores entre 0,2% e 8,1% para as amostras 12 e 2, respectivamente. No entanto, estes valores estão relacionados com a fase de preparação e de fermentação das azeitonas, sendo que existe uma redução na quantidade de açúcares durante e após o processo de fermentação, relacionada com os tratamentos alcalinos, lavagens e armazenamento em salmoura a que as azeitonas estão sujeitas, difundindo-se o açúcar presente na polpa para a salmoura (Ünal & Nergiz, 2003; Malheiro *et al.*, 2012; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012).

Das amostras em estudo a que apresentou maior valor energético foi a amostra 14, com 266 kcal, tendo mais do dobro de energia do que a amostra 15, com o valor mínimo de 131 kcal. Atendendo ao facto do valor energético estar maioritariamente relacionado com o teor de gordura, e que este aumenta com o amadurecimento das azeitonas, pode-se referir que a amostra 14 (azeitonas mistas) tem valores superiores à amostra 15 (azeitonas verdes), possivelmente devido a este fator.

Normalmente o valor calórico das azeitonas de mesa verdes é inferior, devido ao seu reduzido teor de gordura, sendo as azeitonas de mesa pretas as que têm valores superiores (Ünal & Nergiz, 2003).

De um modo geral, estão representados na Figura 9, os valores médios representativos da composição química de todas as amostras em estudo.

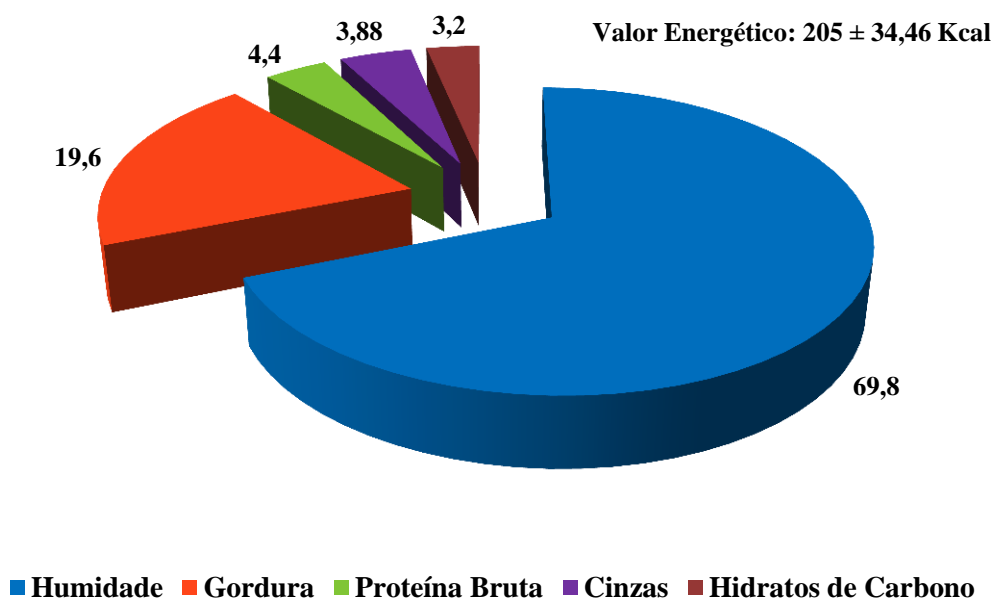


Figura 9. Composição química média das azeitonas de mesa em estudo (%).

4.2.2. Composição em Ácidos Gordos

A composição em ácidos gordos das amostras de azeitonas de mesa em estudo está exposta na Tabela 12, apresentando-se o valor médio e respetivo desvio padrão.

Este parâmetro é regulado principalmente por fatores genéticos, como a cultivar, e por fatores agronómicos e ambientais, numa menor intensidade (Malheiro *et al.*, 2012).

O ácido gordo mais abundante foi o oleico (C_{18:1}) em todas as amostras analisadas, independentemente da cultivar, variando entre 68,28%, na amostra 13, e 82,97%, na amostra 18. Os valores obtidos são aproximados aos relatados por Tofalo *et al.* (2012b) que variam entre 65,7% e 80,2%, relativos a azeitonas de mesa processadas segundo o método de fermentação natural. É de realçar que este foi também o ácido gordo maioritário nas “*alcaparras*”, produzidas a partir da Cv. Cobrançosa e Cv. Negrinha de Freixo, com valores de 68,4% e 72,7%, respetivamente (Malheiro *et al.*, 2012).

O segundo ácido gordo mais abundante foi o palmítico (C_{16:0}) com os seus teores a variarem entre 10,68%, na amostra 18, e 13,68%, na amostra 4. Em terceiro lugar, por ordem de importância, foi o ácido linoleico (C_{18:2cc}) tendo valores bastante variáveis entre as amostras analisadas, variando entre um mínimo de 2,43% para a amostra 16 e um máximo de 10,58% para a amostra 20.

O ácido esteárico (C_{18:0}) foi o quarto em termos de importância tendo ainda alguma representatividade, com um valor mínimo de 1,45%, para a amostra 17, e um valor máximo de 4,88%, obtido na amostra 20.

Os restantes ácidos gordos representados variaram consoante a amostra em questão, não ultrapassando 1% em nenhum dos ácidos gordos, com a exceção do ácido palmitoleico (C_{16:1}) que apresenta valores ligeiramente superiores em algumas amostras.

Para facilitar a comparação nutricional, os ácidos gordos podem ser agrupados em saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), incluindo também os isómeros *trans* (López-López *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012), como se pode verificar na Tabela 13. As azeitonas de mesa são constituídas na sua maioria por MUFA, sendo estes nutricionalmente muito importantes, pois permitem prevenir e reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Kastorini *et al.*, 2010).

Tabela 12. Composição em ácidos gordos, média e desvio padrão, em percentagem (%), das amostras em estudo.

Amostra	Ácidos Gordos (%)												
	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2cc}	C _{20:0}	C _{20:1n9}	C _{18:3n3}	C _{22:0}	C _{24:0}
1	0,00 ± 0,00	12,64 ± 0,04	1,00 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,21 ± 0,01	4,26 ± 0,15	71,02 ± 0,15	9,13 ± 0,13	0,44 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,76 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,00
2	0,00 ± 0,00	11,43 ± 0,23	0,80 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,27 ± 0,01	3,50 ± 0,33	76,39 ± 0,11	5,89 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,05 ± 0,01
3	0,02 ± 0,02	12,49 ± 0,30	0,92 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,26 ± 0,02	3,70 ± 0,21	73,14 ± 0,63	7,62 ± 0,07	0,42 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,78 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01
4	0,00 ± 0,00	13,68 ± 0,10	1,19 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,01	3,17 ± 0,27	71,69 ± 0,85	8,23 ± 0,62	0,40 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,86 ± 0,07	0,13 ± 0,01	0,05 ± 0,00
5	0,01 ± 0,01	12,21 ± 0,23	1,00 ± 0,08	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,06	3,37 ± 0,20	73,05 ± 0,73	8,40 ± 0,78	0,41 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01
6	0,02 ± 0,03	11,86 ± 0,13	0,83 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,25 ± 0,03	3,42 ± 0,02	75,50 ± 0,25	6,35 ± 0,29	0,41 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,05 ± 0,00
7	0,02 ± 0,02	12,61 ± 0,40	1,00 ± 0,09	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,02	3,56 ± 0,13	72,86 ± 0,46	7,76 ± 0,09	0,42 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,87 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,01
8	0,02 ± 0,01	12,24 ± 0,11	0,87 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,24 ± 0,04	3,11 ± 0,30	74,33 ± 0,10	7,37 ± 0,62	0,39 ± 0,04	0,21 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01
9	0,00 ± 0,01	12,98 ± 0,13	0,96 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,24 ± 0,03	3,80 ± 0,14	71,75 ± 0,42	8,48 ± 0,27	0,43 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,84 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01
10	0,00 ± 0,01	12,62 ± 0,80	1,06 ± 0,19	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,01	4,67 ± 0,26	72,29 ± 1,35	7,17 ± 0,73	0,48 ± 0,07	0,19 ± 0,03	0,91 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,03 ± 0,00
11	0,01 ± 0,01	12,15 ± 0,13	1,10 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,00	3,62 ± 0,06	74,06 ± 0,93	7,19 ± 0,98	0,41 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,90 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01
12	0,02 ± 0,02	13,03 ± 0,20	0,95 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,24 ± 0,03	3,50 ± 0,24	72,52 ± 0,72	7,78 ± 0,70	0,44 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,88 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,01
13	0,01 ± 0,01	13,35 ± 0,54	1,01 ± 0,06	0,15 ± 0,00	0,25 ± 0,01	3,75 ± 0,08	68,28 ± 1,41	10,27 ± 0,53	0,40 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,80 ± 0,04	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,01
14	0,00 ± 0,00	12,42 ± 0,31	0,89 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,01	3,63 ± 0,12	71,90 ± 0,67	9,13 ± 0,87	0,43 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,82 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01
15	0,03 ± 0,00	13,43 ± 0,55	1,22 ± 0,13	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	1,69 ± 0,04	78,95 ± 0,22	2,83 ± 0,37	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,05	0,72 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01
16	0,01 ± 0,02	11,65 ± 0,23	0,94 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,12 ± 0,06	1,94 ± 0,18	81,16 ± 0,74	2,43 ± 0,35	0,39 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01
17	0,00 ± 0,00	12,38 ± 0,20	1,17 ± 0,20	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01	1,45 ± 0,02	80,00 ± 0,40	3,26 ± 0,15	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,77 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,02
18	0,01 ± 0,01	10,68 ± 0,48	0,79 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01	1,65 ± 0,05	82,97 ± 0,83	2,48 ± 0,09	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,06 ± 0,03
19	0,02 ± 0,02	12,35 ± 0,31	1,01 ± 0,09	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,01	3,72 ± 0,36	73,92 ± 0,07	6,99 ± 0,15	0,41 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,79 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,05 ± 0,02
20	0,01 ± 0,01	12,14 ± 0,46	0,93 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,21 ± 0,02	4,88 ± 0,76	69,58 ± 0,24	10,58 ± 0,39	0,41 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,00
21	0,00 ± 0,01	12,52 ± 0,15	1,19 ± 0,07	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	1,65 ± 0,08	80,07 ± 0,21	2,88 ± 0,12	0,36 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,66 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Mínimo	0,00 ± 0,00	10,68 ± 0,48	0,79 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	1,45 ± 0,02	68,28 ± 1,41	2,43 ± 0,35	0,34 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,58 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,00
Máximo	0,03 ± 0,00	13,68 ± 0,10	1,22 ± 0,13	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,02	4,88 ± 0,76	82,97 ± 0,83	10,58 ± 0,39	0,48 ± 0,07	0,38 ± 0,03	0,91 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Média ± dp	0,01 ± 0,01	12,42 ± 0,68	1,00 ± 0,14	0,13 ± 0,04	0,21 ± 0,06	3,26 ± 0,92	74,58 ± 3,65	6,70 ± 2,37	0,40 ± 0,03	0,24 ± 0,06	0,79 ± 0,09	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Tabela 13. Valores médios e desvio padrão da composição em ácidos gordos saturados, monoinsaturados, polinsaturados e isômeros *trans*, em percentagem (%), das amostras em estudo.

Amostra	SFA	MUFA	PUFA	Trans
1	17,63 ± 0,07	72,42 ± 0,15	9,89 ± 0,16	0,04 ± 0,01
2	15,68 ± 0,11	77,65 ± 0,14	6,62 ± 0,02	0,04 ± 0,01
3	16,95 ± 0,44	74,53 ± 0,60	8,39 ± 0,05	0,04 ± 0,02
4	17,59 ± 0,23	73,29 ± 0,99	9,09 ± 0,69	0,01 ± 0,02
5	16,30 ± 0,04	74,50 ± 0,83	9,13 ± 0,82	0,05 ± 0,02
6	16,07 ± 0,08	76,80 ± 0,23	7,10 ± 0,27	0,01 ± 0,02
7	16,99 ± 0,27	74,34 ± 0,23	8,63 ± 0,13	0,01 ± 0,02
8	16,06 ± 0,47	75,65 ± 0,17	8,19 ± 0,64	0,10 ± 0,02
9	17,51 ± 0,25	73,13 ± 0,48	9,31 ± 0,25	0,03 ± 0,01
10	18,07 ± 0,49	73,79 ± 1,15	8,08 ± 0,70	0,03 ± 0,01
11	16,47 ± 1,69	75,58 ± 0,92	8,08 ± 1,03	0,04 ± 0,01
12	17,35 ± 0,15	73,94 ± 0,69	8,66 ± 0,68	0,04 ± 0,01
13	17,79 ± 0,44	69,70 ± 1,46	11,07 ± 0,50	0,04 ± 0,01
14	16,79 ± 0,36	73,24 ± 0,68	9,95 ± 0,91	0,02 ± 0,02
15	15,75 ± 0,58	80,61 ± 0,30	3,55 ± 0,65	0,04 ± 0,01
16	14,28 ± 0,37	82,59 ± 0,71	3,10 ± 0,33	0,02 ± 0,03
17	14,43 ± 0,24	81,65 ± 0,50	4,03 ± 1,57	0,02 ± 0,01
18	12,92 ± 0,53	84,22 ± 0,72	3,07 ± 0,08	0,04 ± 0,01
19	16,80 ± 0,15	75,38 ± 0,07	7,78 ± 0,10	0,04 ± 0,01
20	17,71 ± 0,22	70,90 ± 0,21	11,44 ± 0,38	0,04 ± 0,03
21	14,75 ± 0,21	81,69 ± 0,31	3,54 ± 0,12	0,05 ± 0,06
Mínimo	12,92 ± 0,53	69,70 ± 1,46	3,07 ± 0,08	0,01 ± 0,02
Máximo	18,07 ± 0,49	84,22 ± 0,72	11,44 ± 0,38	0,10 ± 0,02
Média ± dp	16,40 ± 1,25	76,04 ± 3,68	7,49 ± 2,43	0,04 ± 0,02

- Saturados = $\sum C_{14:0} + C_{16:0} + C_{17:0} + C_{18:0} + C_{20:0} + C_{22:0} + C_{24:0}$
- Polinsaturados = $\sum C_{18:2cc} + C_{18:3n3}$
- Monoinsaturados = $\sum C_{16:1} + C_{17:1} + C_{18:1} + C_{20:1n9}$
- Isômeros *trans* = $\sum C_{18:1t} + C_{18:2t}$

No que respeita aos ácidos gordos saturados (SFA) o ácido palmítico é o mais representativo. Estes ácidos gordos demonstram resistência à oxidação, sendo o aumento do seu teor proporcional ao aumento da degradação da gordura (López-López *et al.*, 2011), sendo que uma dieta rica neste tipo de gorduras pode induzir doenças cardiovasculares, como arritmias cardíacas e formação de ateromas, devido ao aumento de colesterol LDL no sangue (McLennan, 1993).

Por outro lado, temos os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), em menor proporção que os anteriores, que são muito importantes para a saúde humana, tendo em conta que não são sintetizados pelo nosso corpo (Ghanbari *et al.*, 2012), permitindo reduzir os níveis de colesterol LDL e HDL no sangue, e reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares (McLennan, 1993).

Os ácidos gordos *trans* têm uma expressão muito reduzida, sendo resultantes da degradação da gordura, o seu aumento implica uma diminuição dos ácidos gordos polinsaturados, não apresentando assim degradação aparente (López-López *et al.*, 2011).

4.2.3. Composição em Tocoferóis

A Tabela 14 mostra os resultados obtidos quanto ao teor em tocoferóis presente em cada amostra em estudo, tendo sido identificados quatro vitâmeros da vitamina E: α -, β -, γ - e δ -tocoferol.

O α -Tocoferol foi o mais representativo, sendo o mais abundante em todas as amostras de azeitonas de mesa analisadas, com valores entre 2,68 mg/100 g de polpa de azeitona, na amostra 18 e 6,24 mg/100 g de polpa de azeitona, na amostra 5. No geral, estes valores são superiores aos obtidos para as “*alcaparras*” com 1,20 mg/100 g de peso fresco, reportado por Sousa *et al.* (2011), e inferiores as reportados por Sakouhi *et al.*, (2008), com um valor mínimo de 4 mg/100 g.

É de referir que este é também o maior vitâmero presente nos azeites (Cunha *et al.*, 2006; Beltrán *et al.*, 2010; Ghanbari *et al.*, 2012). O seu conteúdo diminui durante o armazenamento das azeitonas, bem como durante o seu processamento, diminuindo gradualmente durante as mudanças de cor verde para negra (Pereira *et al.*, 2002; Sakouhi *et al.*, 2008).

Em segundo lugar, o δ -tocoferol foi o que apresentou valores superiores, sendo estes bastante variáveis entre as amostras em estudo, variando entre 0,02 mg/100 g de polpa de azeitona, na amostra 12, e 0,97 mg/100 g de polpa de azeitona, na amostra 2.

Os restantes vitâmeros β - e γ -tocoferol apresentaram valores bastante reduzidos, tendo o β -tocoferol valores máximos de 0,03 mg/100 g de polpa de azeitona, e o γ -tocoferol de 0,17 mg/100 g de polpa de azeitona.

O conteúdo total em Vitamina E variou entre 2,98 mg/100 g de polpa de azeitona (amostra 15) e 6,91 mg/100 g de polpa de azeitona (amostra 5), o que são valores

superiores aos registados por Malheiro *et al.* (2012) relativamente a azeitonas verdes descaroadas, e inferiores aos relatados por Sakouhi *et al.* (2008).

Tabela 14. Composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/ 100g de polpa de azeitona) das amostras em estudo (média \pm desvio padrão).

Amostra	α-Tocoferol	β-Tocoferol	γ-Tocoferol	δ-Tocoferol	Total
1	4,36 \pm 0,34	0,02 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01	0,41 \pm 0,07	4,91
2	4,41 \pm 0,08	0,01 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	0,97 \pm 0,04	5,47
3	4,67 \pm 0,15	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02	4,89
4	6,03 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01	6,40
5	6,24 \pm 0,23	0,03 \pm 0,00	0,15 \pm 0,03	0,49 \pm 0,01	6,91
6	5,26 \pm 0,53	0,02 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01	5,79
7	5,59 \pm 0,26	0,02 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	5,79
8	4,70 \pm 0,35	0,02 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,28 \pm 0,02	5,08
9	5,75 \pm 0,44	0,02 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04	6,04
10	4,95 \pm 0,43	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,15 \pm 0,02	5,21
11	5,16 \pm 0,35	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	5,37
12	4,98 \pm 0,13	0,02 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	5,11
13	5,78 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00	6,18
14	5,78 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00	5,96
15	2,94 \pm 0,26	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	2,98
16	3,39 \pm 0,12	0,02 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	3,55
17	2,84 \pm 0,24	0,02 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,16 \pm 0,01	3,07
18	2,68 \pm 0,04	0,02 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,75 \pm 0,03	3,50
19	4,94 \pm 0,07	0,02 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	5,40
20	4,87 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	0,17 \pm 0,02	0,08 \pm 0,00	5,13
21	2,69 \pm 0,07	0,01 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,72 \pm 0,02	3,47
Mínimo	2,68 \pm 0,04	0,01 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	2,98
Máximo	6,24 \pm 0,23	0,03 \pm 0,00	0,17 \pm 0,02	0,97 \pm 0,04	6,91
Média \pm dp	4,74 \pm 1,10	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,04	0,27 \pm 0,26	5,12

A Figura 10 representa os valores médios obtidos, partindo de todas as amostras analisadas, relativamente ao teor em tocoferóis das azeitonas de mesa.

É fácil verificar a enorme proporção do α -tocoferol com 4,74 mg/100g de polpa de azeitona, comparativamente aos restantes isómeros, que não perfazem mais de 0,5 mg/100g de polpa de azeitona.

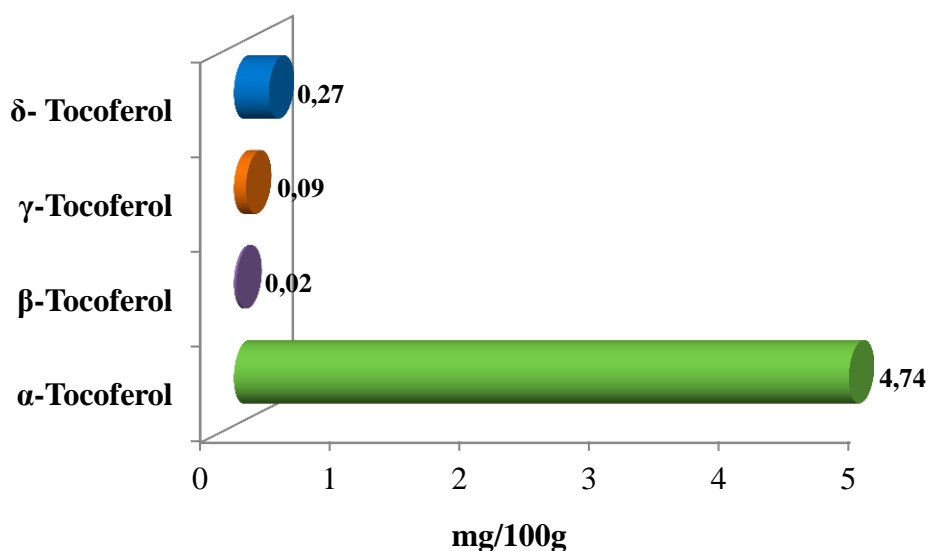


Figura 10. Composição média em tocoferóis (mg/100g de polpa de azeitona) das amostras em estudo.

De forma particular, os tocoferóis são considerados como os antioxidantes lipossolúveis naturais mais importantes, pois impedem a peroxidação lipídica por radicais livres nas membranas e partículas de lipoproteínas (Ghanbari *et al.*, 2012).

As azeitonas de mesa constituem uma boa fonte destes compostos, sendo cada vez mais apreciadas e consumidas, não só pelas suas características sensoriais, mas também devido à sua composição.

4.3. Análise estatística

4.3.1. Análise de componentes principais (ACP) – Parâmetros biométricos

Uma vez recolhidos todos os dados biométricos das 21 amostras de azeitonas Transmontanas de fermentação natural, procedeu-se à realização de uma Análise de Componentes Principais (ACP), tendo em conta as seguintes variáveis: peso, comprimento, $D_{\text{máx}}$, $D_{\text{mín}}$, e forma, tanto dos frutos como dos respetivos endocarpos. Na Figura 11 está representada a ACP obtida com as variáveis em questão.

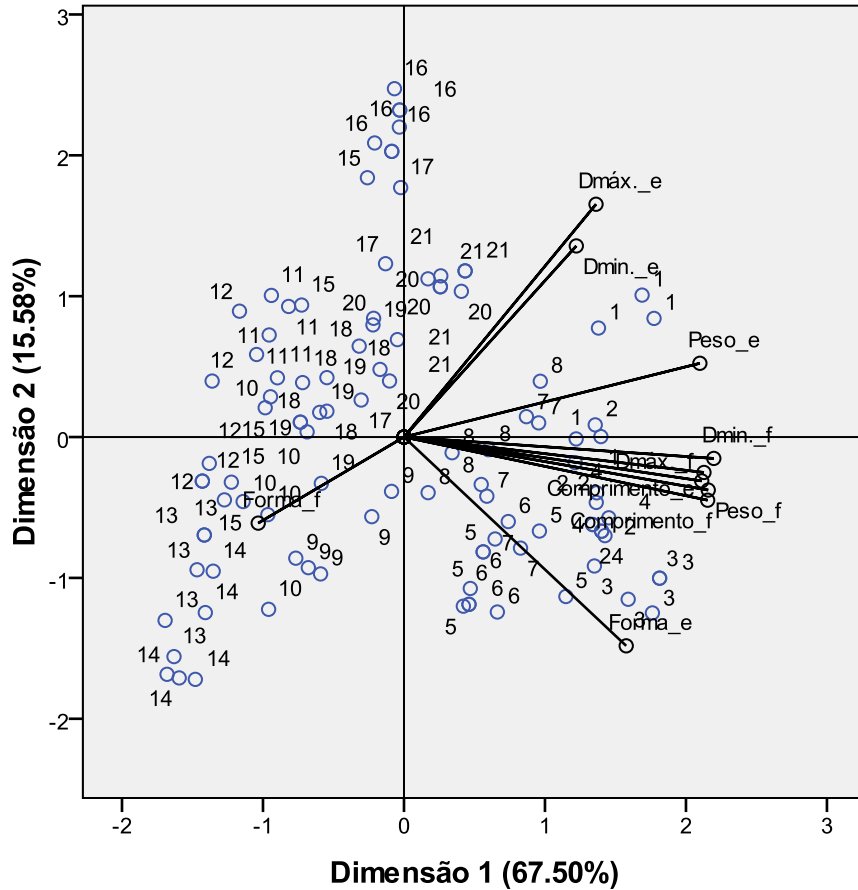


Figura 11. ACP usando as variáveis biométricas (peso, comprimento, $D_{máx}$, D_{min} , e forma) de frutos e endocarpos de 21 amostras de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 83.07% da variância total dos dados.

Verifica-se que não houve um claro agrupamento de acordo com a amostra em si, no entanto é observável a formação de dois grupos, estando representadas na região positiva da primeira dimensão as azeitonas de mesa com maior calibre, reportando assim maior valor real das variáveis em estudo. As restantes amostras, representadas na região negativa da primeira dimensão, apresentam valores reais mais baixos em relação às variáveis em estudo, excetuando as amostras representadas na região negativa de ambas as dimensões, que apresentam uma maior razão entre o comprimento e o $D_{máx}$ dos frutos (o que corresponde à forma). Não se verificou qualquer separação relativamente à cultivar.

4.3.2. Análise de componentes principais (ACP) – Composição Química

No que respeita à composição química, foi realizada uma ACP com todos os dados químicos obtidos, incluindo ácidos gordos (individuais e classes) e os tocoferóis.

A variância explicada pelas duas dimensões corresponde apenas a 57,56%, como se pode verificar na Figura 12. Na região positiva da primeira dimensão estão representadas todas as amostras relativas à cultivar Cobrançosa, mais ricas em gordura e cinza e apresentando um maior valor energético.

No lado oposto à representação das amostras da Cv. Cobrançosa estão representadas 5 amostras, sendo todas elas de outras cultivares que não Cobrançosa. As amostras números 15, 17 e 18 correspondem a azeitonas de mesa da Cv. Negrinha de Freixo e as amostras números 16 e 21 correspondem a cultivares desconhecidas. Estas apresentaram maiores teores de humidade, hidratos de carbono e proteínas. Quanto ao perfil em tocoferóis as amostras da Cv. Cobrançosa são ricas em α - e β -tocoferol, tendo assim maior teor de vitamina E total. As restantes amostras são mais ricas em δ -tocoferol.

Após a obtenção destes resultados voltou-se a fazer uma ACP mas incluindo apenas os dados do perfil em ácidos gordos e suas classes, por vezes descritos como marcadores para as cultivares. Usando apenas duas dimensões, ou componentes principais, passou a ser possível explicar 70.4% da variância total dos dados, como se pode verificar na Figura 13.

A tendência mantém-se estando as amostras da Cv. Cobrançosa representadas na região positiva da primeira dimensão e as restantes amostras na região oposta. Segundo a ACP, as amostras da Cv. Cobrançosa foram as que apresentaram maior teor em ácidos gordos saturados (SFA) e polinsaturados (PUFA), muito pela contribuição dos ácidos palmítico e esteárico ($C_{16:0}$ e $C_{18:0}$ respetivamente) no caso dos SFA e dos ácidos gordos linoleico e linolénico ($C_{18:2}$ e $C_{18:3}$ respetivamente) no caso dos PUFA.

As amostras representadas na zona negativa do eixo principal são aparentemente mais ricas em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), com especial prevalência para o ácido oleico ($C_{18:1}$). No entanto alguns SFA de menor expressão como sendo os ácidos behénico e lignocérico ($C_{22:0}$ e $C_{24:0}$ respetivamente) também aparecem aumentados.

Verificou-se assim que apenas com o perfil em ácidos gordos é possível distinguir as cultivares de azeitona que deram origem às azeitonas de mesa Transmontanas provenientes de fermentação natural.

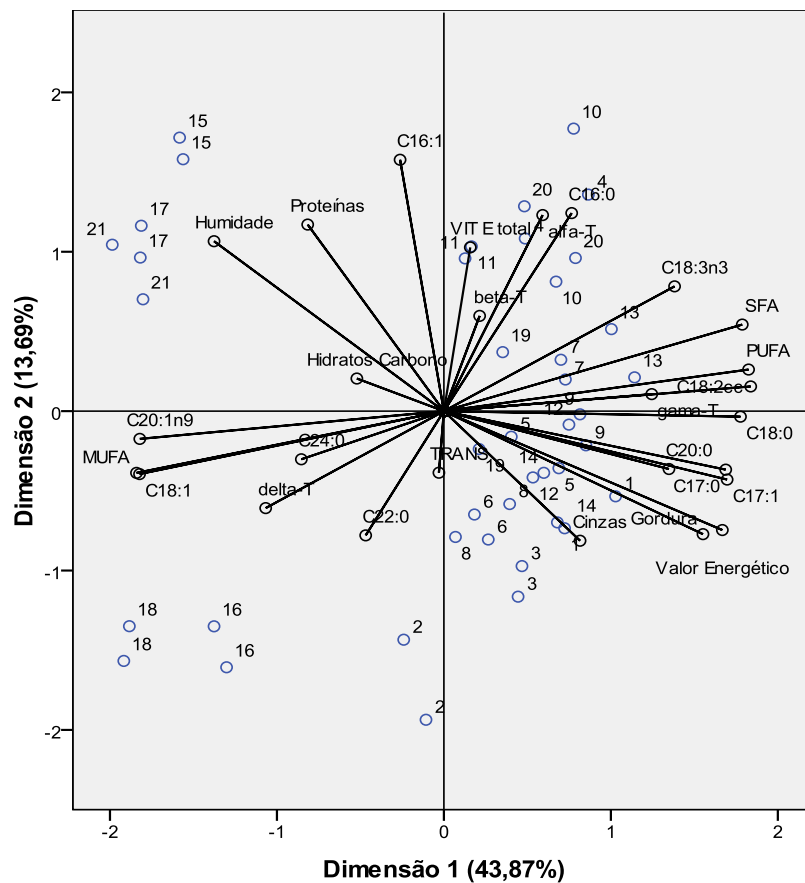


Figura 12. ACP usando a composição em ácidos gordos (individuais e respetivas classes), composição química e composição em tocoferóis de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 57.56% da variância total dos dados.

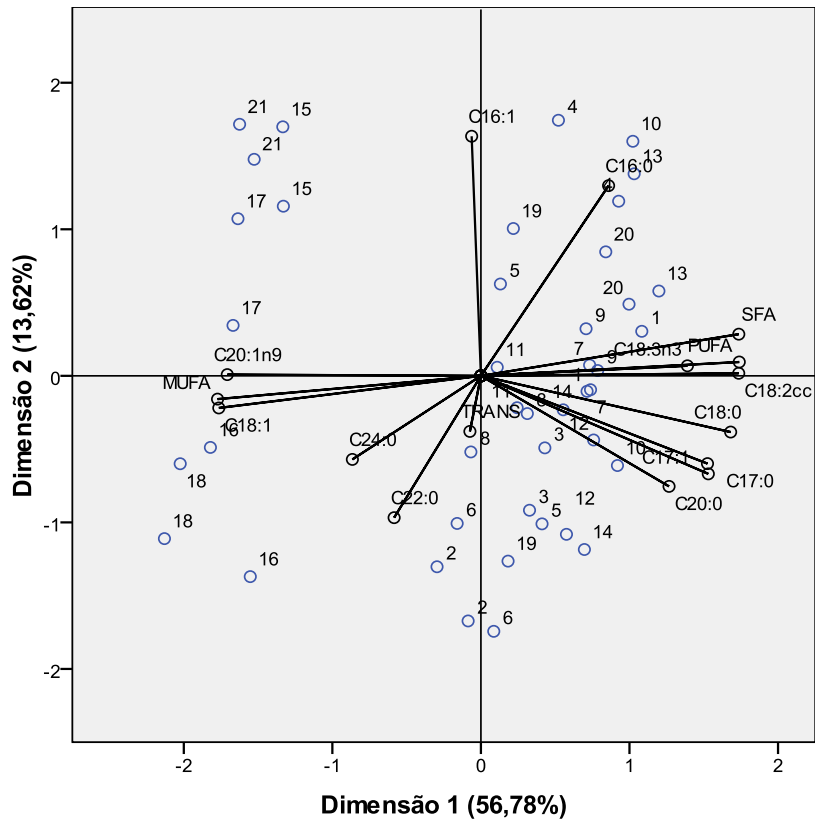


Figura 13. ACP usando a composição em ácidos gordos (individuais e grupos) de azeitonas de mesa Transmontanas obtidas pelo método de fermentação natural. As duas dimensões explicam 70,40% da variância total dos dados.

4.4. Parâmetros microbiológicos

4.4.1. Segurança microbiológica

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2010) e a NP - 3034 (1987), as azeitonas de mesa, assim como todos os produtos alimentares, devem estar isentas de microrganismos patogénicos e suas toxinas, ou de qualquer outro agente contaminante. No caso de azeitonas fermentadas e conservadas, mediante características próprias, podem-se detetar os microrganismos que estão envolvidos no processo de fermentação. Neste sentido, os microrganismos mais relevantes, a ter em conta, são *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas e leveduras (Arroyo-López *et al.*, 2010; Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Panagou *et al.*, 2008).

Nas Tabelas 15 e 16 encontram-se os resultados da análise microbiológica realizada na polpa e salmoura de azeitonas de mesa.

A população de mesófilos apresentou valores mais elevados na salmoura do que na polpa de azeitona, à exceção da amostra 3. Assim, as contagens obtidas na polpa de azeitona situaram-se entre 1×10^2 e 6×10^4 UFC/g e na salmoura de 9×10^2 a 2×10^5 UFC/ml. Contagens elevadas deste grupo de microrganismos na salmoura foram também observadas por Pereira *et al.* (2008) em amostras de salmoura de cobertura de azeitonas mistas ao natural, obtidas no mercado tradicional, e por Tofalo *et al.* (2012b) em azeitonas processadas por fermentação natural de diferentes cultivares italianas.

Em relação à contagem de leveduras, verificou-se que as mesmas foram também mais elevadas na solução de salmoura, com exceção da amostra 4, tendo sido o valor máximo obtido de 1×10^6 UFC/ml (6 log UFC/ml) para as amostras 1 e 3 de salmoura. Estes resultados encontram-se dentro do intervalo obtido por outros autores (Marquina *et al.*, 1992; Nisiotou *et al.*, 2009) (4 e 6 log UFC/ml), e são inferiores ao limite máximo estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (2010), o qual indica que, dependendo da fase de fermentação, o número de leveduras pode ir até 10^9 UFC/ml ou por grama, na salmoura ou polpa respetivamente. Convém realçar, que no final do processo de fermentação as leveduras e bactérias ácido lácticas são os organismos dominantes na salmoura (Nychas *et al.*, 2002), e como a maioria das bactérias lácticas são basicamente mesófilas (Forsythe, 2007), justifica-se assim os valores elevados destes microrganismos nas amostras analisadas.

Os valores mais elevados de leveduras comparativamente aos mesófilos, poderão

estar relacionados com facto das leveduras serem mais tolerantes ao NaCl, utilizado em concentrações entre 8-10% (Panagou *et al.*, 2008; Rejano *et al.*, 2010), e aos compostos fenólicos (Pereira *et al.*, 2008), sendo importante revelar que as bactérias lácticas são inibidas em meios com concentração de NaCl superior a 8% (Quintana *et al.*, 1997). Refira-se também que as leveduras podem ainda ser úteis para fins de controlo biológico, pois não são microrganismos patogénicos pelo facto de não produzirem esporos ou micotoxinas (Psani *et al.*, 2006), e podem produzir compostos voláteis e metabolitos que melhoram as características sensoriais do produto. No entanto, se estiverem presentes em valores superiores a 10^9 UFC/g ou ml, também podem ter efeitos negativos como uma maior produção de CO₂, que pode penetrar nas azeitonas e danificá-las (Arroyo-López *et al.*, 2008), formação de outros gases, amolecimento da polpa, abaulamento dos pacotes onde são embaladas, turvação das salmouras ou produção de odores e sabores indesejáveis (Tofalo *et al.*, 2012b). Para além disto, a presença excessiva de leveduras nos alimentos, poderá indicar manipulação inadequada do produto, podendo ter havido falhas na limpeza da matéria-prima e/ou manuseio realizado em condições insatisfatórias, bem como contaminação durante as etapas de processamento do produto.

Tabela 15. Contagens de microrganismos em amostras de polpa de azeitona (UFC/g).

Amostra	Mesófilos	Leveduras	Coliformes	<i>E. coli</i>	Esporos clostrídios	<i>S. aureus</i>	Salmonella
1	7×10^2	4×10^5	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
2	4×10^3	1×10^5	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
3	3×10^3	3×10^5	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
4	6×10^4	6×10^5	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
5	4×10^3	5×10^4	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
6	1×10^2	2×10^2	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
7	4×10^4	8×10^4	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
8	4×10^3	1×10^4	<10	<10	<10	<10 ²	ausente

Tabela 16. Contagens de microrganismos em amostras de salmoura (UFC/ml).

Amostra	Mesófilos	Leveduras	Coliformes	<i>E.coli</i>	Esporos clostrídios	<i>S. aureus</i>	Salmonella
1	1×10 ⁴	1×10 ⁶	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
2	2×10 ⁵	7×10 ⁵	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
3	2×10 ³	1×10 ⁶	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
4	1×10 ⁵	2×10 ⁵	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
5	4×10 ⁴	1×10 ⁵	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
6	9×10 ²	8×10 ²	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
7	1×10 ⁵	9×10 ⁵	<10	<10	<10	<10 ²	ausente
8	5×10 ³	8×10 ³	<10	<10	<10	<10 ²	ausente

Nas análises efetuadas à polpa de azeitona (Tabela 15) e à salmoura (Tabela 16), não foram contabilizadas colónias viáveis de coliformes totais e *E. coli*, à semelhança do observado por Pereira *et al.* (2008) na polpa e na salmoura de cobertura de amostras de azeitonas mistas ao natural e de azeitonas naturais da Cv. Galega, bem como por Alves *et al.* (2012) onde não foram detetadas colónias típicas de *E. coli* em todo o estudo realizado em azeitonas verdes quebradas.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, sugerem boas condições de higiene ao longo do processamento das azeitonas, uma vez que estes microrganismos são considerados indicadores de contaminação fecal.

Em relação aos clostrídios sulfito redutores, também não foram contabilizadas colónias viáveis, ao contrário do observado por Pereira *et al.* (2008), na polpa e salmoura da maioria das amostras produzidas por fermentação natural. A pesquisa deste grupo de microrganismos, anaeróbios e esporulados, em alimentos torna-se importante uma vez que nos pode fornecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *C. perfringens* e *C. botulinum*, duas espécies capazes de causar toxinfecções alimentares.

Em relação ao *S. aureus*, não foram detetadas colónias viáveis nas amostras analisadas. Esta bactéria tolera concentrações de NaCl de 5 – 7% e encontra-se presente no ar, poeira, fossas nasais, garganta e pele do Homem e animais, sendo os manipuladores as principais fontes de contaminação dos alimentos. Algumas estirpes são capazes de produzir uma enterotoxina muito estável, que representa um risco potencial para a saúde dos consumidores.

Em todas as amostras analisadas não foi detetada a presença de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra. Este microrganismo encontra-se normalmente no trato intestinal do Homem e animais como microrganismos comensais ou patogénicos. O género *Salmonella*

spp. pode causar diferentes síndromes clínicas que vão desde ligeiras gastroenterites a complicadas doenças sistêmicas como a febre tifoide.

Fatores como o pH (3,96 - 4,18), concentração de NaCl (7,86 - 9,54% p/v) e disponibilidade de substrato podem afetar e limitar o crescimento de microrganismos patogênicos (Hernández *et al.*, 2007; Tofalo *et al.*, 2012b), nomeadamente de *Salmonella* spp. e de *S. aureus*, bem como a presença de outros microrganismos indesejáveis.

De referir que, no caso de serem detetados microrganismos patogênicos numa amostra, esta deve ser considerada potencialmente perigosa e assim imprópria para consumo (Pereira *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012b).

4.4.2. Identificação de leveduras e atividade enzimática

Na Tabela 17 estão referidas todas as leveduras identificadas, tanto por identificação molecular como pelas galerias API 20C AUX, diferenciando as que se encontram presentes na polpa e na salmoura.

Tabela 17. Isolados de leveduras provenientes da polpa de azeitona e salmoura, identificados por sequenciação parcial do gene rDNA 26S e galerias API 20C AUX.

Espécies identificadas	Número da amostra	Polpa	Salmoura
<i>Pichia membranifaciens</i>	1	-	+
<i>Candida ishiwadae</i>	1, 5	+	+
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	-	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4, 5, 8	+	+
<i>Pichia manshurica</i>	4, 5, 8	+	+
<i>Candida boidinii</i>	7	-	+
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	6	+	-
<i>Candida lipolytica</i>	4, 8	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	2	+	-

Atendendo aos resultados expressados na tabela 17, verifica-se que as leveduras identificadas predominam na salmoura. Assim, nesta solução, as leveduras identificadas foram *P. membranifaciens*, *C. ishiwadae*, *S. roseus*, *W. anomalus* (anteriormente designada *Pichia anomala*), *P. manshurica*, *S. paradoxus* e *C. tropicalis*.

Pichia manshurica (também designada por *Pichia galeiformis*) e a *W. anomalus* foram as leveduras mais frequentes nas amostras analisadas, sendo encontrada tanto na polpa como na salmoura. Estes resultados estão de acordo com o referenciado por Bautista-

Gallego *et al.* (2011), onde estas espécies são referidas como as predominantes no final do processo de fermentação.

P. membranifaciens isolada exclusivamente na salmoura, tem sido frequentemente referenciada em diversas preparações de azeitonas verdes e pretas (Coton *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010), bem como a *W. anomalus* (Hernández *et al.*, 2007). Estas duas espécies foram descritas por Hernández *et al.* (2007), como sendo as predominantes na salmoura de azeitonas naturais, de diferentes regiões de Portugal.

Candida boidini é uma das espécies mais referenciadas pela literatura, pela sua abundante presença nas azeitonas de mesa de fermentação natural (Coton *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010) e também na polpa de azeitonas mistas naturais, provenientes do mercado tradicional (Pereira *et al.*, 2008). Ao contrário destes autores, esta espécie foi apenas isolada, neste trabalho, na salmoura.

De entre a literatura pesquisada, a presença de *C. ishiwadae* apenas é referenciada por Coton *et al.* (2006) na salmoura de amostras de azeitonas pretas naturais, onde esta é considerada uma nova espécie presente em azeitonas, sendo que nas amostras analisadas a sua presença foi verificada na polpa e salmoura.

S. roseus isolada na salmoura da amostra 1, também foi referenciada por Kotzekidou (1997) em azeitonas pretas de estilo grego. Esta espécie, devido à presença de um pigmento carotenoide, apresenta uma coloração alaranjada/salmão, tal como se pode observar na Figura 14.

Do género *Saccharomyces* a mais comum é a *S. cerevisiae* referenciada por Alves *et al.* (2012), como sendo das espécies mais isoladas na salmoura de azeitonas verdes quebradas, e por Rodríguez-Gómez *et al.* (2010), como sendo uma levedura associada à fermentação das azeitonas. Tendo em conta que as amostras analisadas se encontravam na fase final de fermentação, esta levedura não foi detetada. Deste género apenas foi isolada a *S. paradoxus*, cuja presença em azeitonas de mesa não é mencionada por nenhum dos autores pesquisados.

C. tropicalis é referenciada por Arroyo-López *et al.* (2008) e Bautista-Gallego *et al.* (2011) como uma espécie identificada nos primeiros estádios da fermentação. Contudo, no presente trabalho esta espécie foi isolada na fase final de fermentação. Segundo Arroyo-López *et al.* (2008), esta espécie tem a capacidade degradar os polifenóis.

De forma geral, a maioria das leveduras identificadas neste trabalho também são referenciadas por Arroyo-López *et al.* (2008), Pereira *et al.* (2008) e Bautista-Gallego *et al.* (2011).

O “aspeto” macroscópico de todas as leveduras identificadas por sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rDNA, é visível na Figura 14. Tal como se pode observar nesta figura, a coloração das colónias varia desde o branco ao bege, excetuando a *S. roseus* com coloração alaranjada/salmão.

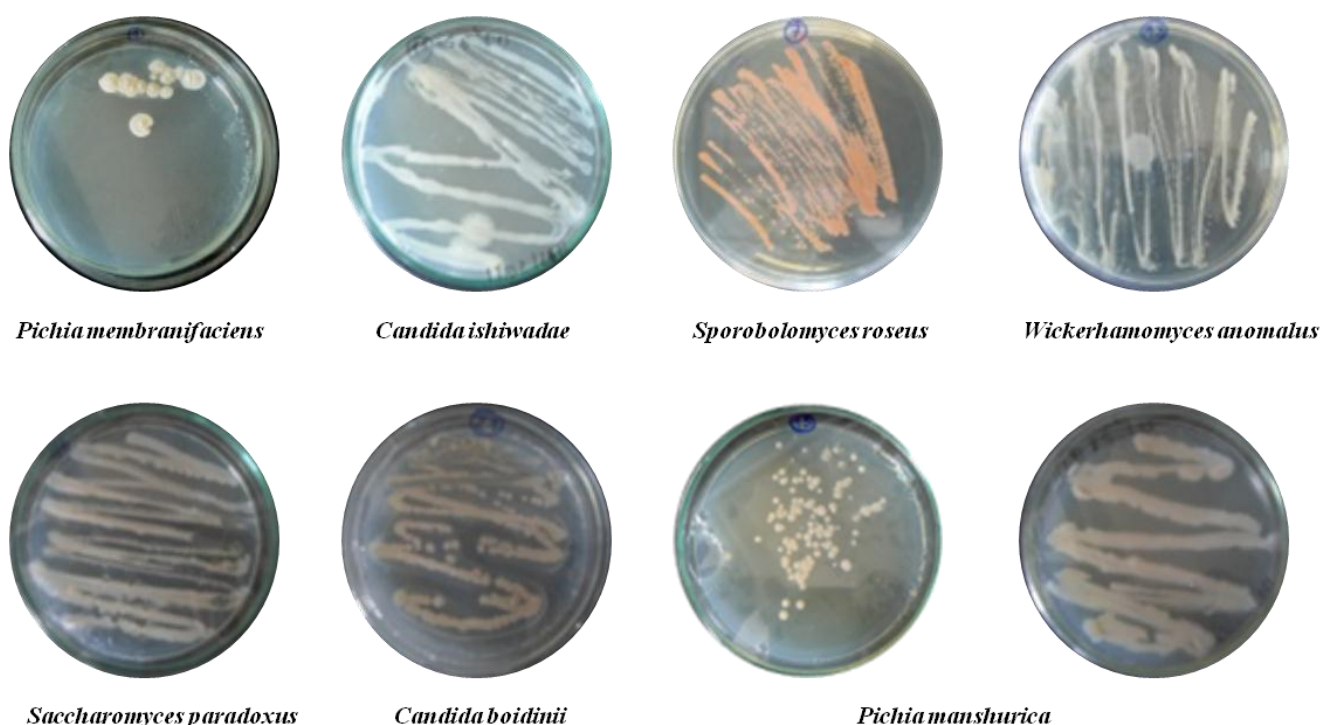


Figura 14. Espécies de leveduras identificadas por sequenciação da região D1/D2 do gene 26S rDNA.

Na Tabela 18 apresentam-se os resultados respeitantes à avaliação da atividade enzimática, através de testes qualitativos, das leveduras identificadas por sequenciação.

A atividade da β -glucosidase é evidenciada pela maioria das estirpes identificadas, com a exceção da *P. manshurica* e *C. boidinii*. Bautista-Gallego *et al.* (2011) referem também considerável produção de β -glucosidase em *W. anomalus* isolada de azeitonas preparadas pelo Estilo grego e Sevilhano. Segundo Arroyo-López *et al.* (2008), a presença de microrganismos com atividade β -glucosidase é conveniente no processo de fermentação de azeitonas, porque podem hidrolisar a oleuropeína-glucosidase, removendo assim a amargura natural presente nas azeitonas de mesa.

Tabela 18. Atividade enzimática das leveduras identificadas.

Levedura	Substrato	Protease	β -Glucosidase	Amilase	Esterase	Lipase	Catalase
<i>Pichia membranifaciens</i>	Salmoura	-	+	-	-	-	pr.
<i>Candida ishiwadae</i>	Azeitona	+++	+++	-	-	-	pr.
<i>Candida ishiwadae</i>	Salmoura	+++	+++	-	-	-	pr.
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Salmoura	+++	+++	++	++	++	pr.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Salmoura	+++	+++	++	-	-	pr.
<i>Pichia manshurica</i>	Azeitona	-	-	-	-	-	pr.
<i>Pichia manshurica</i>	Salmoura	-	-	-	-	-	pr.
<i>Candida boidinii</i>	Salmoura	-	-	-	-	-	pr.
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	Azeitona	-	++	-	-	-	pr.

“-“ (nenhuma atividade); “+” (fraca atividade); “++” (moderada atividade); “+++” (forte atividade). Catalase: “au.” (ausência); “pr.” (presença).

Das leveduras identificadas, no presente trabalho, apenas *S. roseus* apresentou atividade lipolítica e esterásica. Bautista-Gallego *et al.* (2011) detetaram atividade destas enzimas em *W. anomalus* isolada da Cv. Gordal, tendo, no entanto, obtido resultado negativo para a mesma espécie isolada da Cv. Manzanilla. Também estes autores detetaram atividade lipolítica em *C. boidinii* obtida da Cv. Manzanilla, à semelhança do observado por Rodríguez-Gómez *et al.* (2010).

De acordo com Hernández *et al.* (2007) e Rodríguez-Gómez *et al.* (2010), leveduras com atividade esterásica e lipolítica são desejáveis durante a fermentação, porque podem melhorar o *flavour* das azeitonas de mesa, através da formação de compostos voláteis que podem ser produzidos pelo catabolismo dos ácidos gordos livres.

Em relação à atividade da enzima catalase, todos os isolados de leveduras testados exibiram essa atividade (Tabela 18). Também Hernández *et al.* (2007) e Bautista-Gallego *et al.* (2011) detetaram atividade desta enzima para a maioria dos isolados testados. Segundo Hernández *et al.* (2007), estirpes catalase positivas são desejáveis durante a fermentação porque podem contribuir para a preservação de azeitonas, reduzindo a oxidação de ácidos gordos insaturados e a formação de peróxido de hidrogénio.

A atividade da amilase foi apenas evidenciada pelas leveduras *W. anomalus* e *S. roseus*. Os microrganismos com a capacidade de produzir amilases podem ser utilizados para diversos fins biotecnológicos, sendo o exemplo da indústria alimentar, onde estes podem eliminar a turvação produzida pelos amidos em diversos produtos.

Convém realçar que *S. roseus*, pouco frequente em azeitonas de mesa, foi a que apresentou uma maior atividade enzimática, pois produziu todas as enzimas testadas.



Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

As azeitonas de mesa processadas por fermentação natural são um produto cada vez mais usual na região de Trás-os-Montes. Este tipo de preparação permite remover o amargor natural das azeitonas frescas, essencialmente devido à presença de oleuropeína, sem recorrer à utilização de um tratamento alcalino, ocorrendo a fermentação, quase exclusivamente devido à atividade de leveduras.

Ao nível morfológico é possível referir que os parâmetros analisados não demonstram uma notável conformidade que permita utilizar os valores obtidos para diferenciar as amostras entre si. A forma é o único parâmetro que não apresenta valores muito díspares entre as amostras analisadas, tanto no fruto como no endocarpo, apresentando todas as amostras forma ovóide e elíptica, respetivamente.

Ao nível nutricional, as cultivares de azeitonas de mesa produzidas segundo o método de fermentação natural são constituídas maioritariamente por água e gordura, com valores médios de 69,8% e 19,6%, respetivamente. Contudo, as diversas amostras apresentam estados de maturação distintos, sendo a concentração de gordura superior nas amostras mais maduras (azeitonas pretas), comparativamente às azeitonas que se apresentam no início do processo de maturação (azeitonas verdes). Neste sentido, o valor energético das azeitonas é influenciado pelo seu estado de maturação, apresentando valores variáveis entre 131 kcal e 267 kcal.

Independentemente da cultivar ou do estado de maturação das azeitonas, a gordura das amostras estudadas é maioritariamente constituída por ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) tendo valores superiores a 69,70% em todas as amostras. Os ácidos gordos saturados (SFA) apresentam-se em proporções reduzidas, no entanto são os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) os que detêm menores valores. O ácido oleico é o maioritário em todas as amostras, representando em média 74,58% do total em ácidos gordos.

As azeitonas de mesa são ainda constituídas por uma quantidade apreciável de compostos com potencial biológico e antioxidante, como os tocoferóis. O α -tocoferol é o isómero maioritário em todas as amostras, apresentando valores médios de 4,74 mg/100g de polpa de azeitona.

Ao nível microbiológico, todas as amostras podem ser consideradas seguras para o consumidor, apesar de terem sido detetados leveduras e microrganismos aeróbios mesófilos, sempre em valores inferiores aos permitidos por lei ($<10^9$ UFC/g ou ml).

Realce-se que não foi detetada a presença de microrganismos patogénicos, nomeadamente *S. aureus* e *Salmonella* spp. em todas as amostras analisadas.

No que respeita à atividade enzimática das leveduras analisadas, a *Sporobolomyces roseus* apresenta capacidade de produção de todas as enzimas testadas, sendo a levedura que revela um maior potencial biotecnológico.

Com o presente trabalho pretende-se contribuir com informação que possibilite a criação de uma Denominação de Origem Protegida de azeitonas de mesa naturais de Trás-os-Montes.

Referências Bibliográficas

- Alves, M. (2007). Caracterização e estrutura genéticas da Cultivar de Oliveira “Cobrançosa” e sua relação com o Zambujeiro. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Lisboa, para obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Biotecnológica.
- Alves, M.; Gonçalves, T.; Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives fermentations. *Food Control*, **23**, 363-368.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1995.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC: Arlington, VA, 2000; Vol. II, 40, pp 1-3.
- Aponte, M.; Ventorino, V.; Blaiotta, G.; Volpe, G.; Farina, V.; Avellone, G.; Lanza, C. M.; Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, **27**, 162-170.
- 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**, 189-196.
- Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Garrido-Fernández, A. (2010). Predictive microbiology and table olives. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 1452-1461. Vol. II, Formatex Research Center, Badajoz, Espanha. ISBN (13): 978-84-614-6195-0.
- Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2001). *El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, 4ª Edição, Madrid (Espanha). ISBN: 84-7114-983-4.
- 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**, 89-96.

- Beltrán, G.; Jiménez, A.; Rio, C.; Sánchez, S.; Martínez, L.; Uceda, M.; Aguilera, M. P. (2010). Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 633-639.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 229-242.
- Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sanchez, A. H.; Garrido, A. (1995). Biochemical Changes in Phenolic Compounds during Spanish-Style Green Olive Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2702-2706.
- Cabezas, J. M. E. (2011). La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Fotomecánica e impresión: Imprenta tecé, Sevilha.
- Campaniello, D; Bevilacqua, A.; D'Amato, D.; Corbo, M. R.; Altieri, C.; Sinigaglia, M. (2005). Microbial Characterization of Table Olives Processed According to Spanish and Natural Styles. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, 289-294.
- Cardoso, S. M.; Mafra, I.; Reis, A.; Nunes, C.; Saraiva, J. A.; Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell Wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT - Food Science and Technology*, **43**, 153-160.
- Castro, A.; Brenes, M. (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, **36**, 797-802.
- Codex Alimentarius (2010). Proposed Draft Codex Standard for Table Olives (Revision of Codex Stan 66-1981). http://www.cclac.org/documentos/CCPFV/2010/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/pf25_04e.pdf. Acedido a 20 de Junho de 2012.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (1996). Enciclopedia Mundial del Olivo. Plaza & Janés Editores, S. A., 1ª Edição, Barcelona (Espanha). ISBN: 84-01-61877-0.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2004). Trade standard applying to table olives. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>. Acedido a 2 de Outubro de 2011.
- COI – Conselho Oleícola Internacional (2011). <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>. Acedido a 16 de Maio de 2012.
- Comissão Europeia – Agricultura e Desenvolvimento Rural. <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html;jsessionid=pL0hLqQLXhNmFQyF11b24mY3t9dJQPflg3xbL2YphGT4k6zdWn34!-370879141>. Acedido a 10 de Julho de 2012.

- Conde, C.; Delrot, S.; Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 1545-1562.
- Coton, E.; Coton, M.; Levert, D.; Casaregola, S.; Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 130-135.
- Cunha, S. C.; Amaral, J. S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P. (2006). Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3351-3356.
- Dabbou, S.; Issaoui, M.; Brahmi, F.; Nakbi, A.; Chehab, H.; Mechri, B.; Hammami, M. (2012). Changes in Volatile Compounds During Processing of Tunisian-Style Table Olives. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **89**, 347-354.
- Despacho Normativo nº 293/93, de 1 de Outubro. “Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo”. <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName.html?denominationId=111>. Acedido a 20 de Fevereiro de 2012.
- Fernández, A. G.; Díez, M. J. F.; Adams, M. R. (1997). *Table olives. Production and processing*. Chapman & Hall. London, UK.
- Forsythe, S. J. (2007). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Artmed Editora, Porto Alegre (Brasil). ISBN: 978-85-7307-988-3.
- Galanakis, C. M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 175-184.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 3291-3340.
- Gómez, A. H. S.; García, P. G.; Navarro, L. R. (2006). Trends in table olives production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, 86-94.
- Gupta, R.; Rathi, P.; Gupa, N.; Bradoo, S. (2003). REVIEW - Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **37**, 63-71.
- Hammami, S. B. M.; Manrique, T.; Rapoport, H. F. (2011). Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae*, **130**, 445-451.

- Hernández, A.; Martín, A.; Aranda, E.; Pérez-Nevado, F.; Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, **24**, 346-351
- 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**, 738-744.
- INE, 2011. Estatísticas de Produção vegetal. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&userLoadSave=Load&userTableOrder=173&tipoSelecao=1&c. Acedido a 30 de Junho de 2012.
- ISO 4833 (2003). Microbiology of food biology and animal food and feeding stuffs – Horizontal methods for the enumeration of microorganismos – Colony count technique at 30 degrees C.
- Kanavouras, A.; Gazouli, M.; Leonidas, L. T.; Petrakis, C. (2005). Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, **56**, 106-115.
- Kastorini, C.M.; Milionis, H.J.; Goudevenos, J.A.; Panagiotakos, D.B. (2010). Mediterranean diet and coronary heart disease: Is obesity a link? - A systematic review. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **20**, 536-551.
- Kotzekidou, P. (1997). Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, **14**, 609-616.
- Leitão, F.; Potes, M. F.; Calado, M. L.; Almeida, F.J. (1986). Descrição de 22 variedades de Oliveira cultivadas em Portugal. Resopal, Direcção-Geral de Planeamento e Agricultura, Lisboa.
- López-López, A.; Cortés-Delgado, A.; Garrido-Fernandéz, A. (2011). Chemometric characterisation of the fats released during the conditioning processes of table olives. *Food Chemistry*, **126**, 1620-1628.
- Mafra, I; Reis, A.; Coimbra, M. A. (2003). Efeito do processamento de azeitonas pretas oxidadas nos polissacarídeos das paredes celulares da polpa de azeitonas Douro. 6º Encontro de Química de Alimentos, Lisboa.
- Malheiro, R.; Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2011). Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 450-457.
- Malheiro, R.; Casal, S.; Sousa, A.; 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 Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-011-0567-x.
- Marsilio, V.; Campestre, C.; Lanza, B.; Angelis, M. (2001a). Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. *Food Chemistry*, **72**, 485-490.
- Marsilio, V.; Campestre, C.; Lanza, B. (2001b). Phenolic compounds during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55-60.
- Marquina, D.; Peres, C.; Caldas, F.V.; Marques, F.V.; Peinado, J.M.; Spencer, M. (1992). Characterization of the yeast populations in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, **14**, 279-283.
- McLennan, P. L. (1993). Relative effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 207-212.
- Montaño, A.; Sánchez, A.H.; Casado, F.J.; Castro, A.; Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*, **82**, 297-302.
- Montaño, A.; Casado, F. J.; Castro, A.; Sánchez, A. H.; Rejano, L. (2005). Influence of processing, storage time, and pasteurization upon the tocopherol and amino acid contents of treated green table olives. *European Food Research and Technology*, **220**, 255-260.
- Monteiro, A. M. (1999). A oliveira. Série Património Natural Transmontano. João Azevedo, Editor. Mirandela.
- Nesaretnam, K., Yew, W.W., Wahid, M.B. (2007). Tocotrienols and cancer: Beyond antioxidant activity. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 445-452.
- 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**, 396-405.
- Norma Portuguesa (NP) 2262, 1986. Pesquisa de clostrídios sulfite redutores.
- Norma Portuguesa (NP) 3034, 1987. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação.
- Norma Portuguesa (NP) 4400-1 (2002). Regras gerais para a contagem de *staphylococcus* coagulase positiva.

- Nychas, G.-J. E.; Panagou, E. Z.; Parker, M. L.; Waldron, K. W.; Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 173-177.
- Othman, N. B.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, F.; Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, 662-669.
- Panagou, E. Z.; Katsaboxakis, C. Z. (2006a). Effect of different brining treatments on the fermentation of Cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. *Food Microbiology*, **23**, 199-204.
- Panagou, E. Z.; Tassou, C. C. (2006b). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of Cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, **23**, 738-746.
- Panagou, E. Z.; Schillingerb, U.; Franz, C. M.A.P.; Nychas, G.-J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of Cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **25**, 348-358.
- 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**, 1301-1307.
- Parinos, C. S.; Stalikas, C.D.; Giannopoulos, T. S.; Pilidis, G.A. (2007). Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, **145**, 339-343.
- Pinheiro, P. B. M.; Silva, J. C. G. E. (2005). Chemometric classification of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L.. *Analytica Chimica Acta*, **544**, 229-235.
- Pereira, J. A.; Casal, S.; Bento, A.; Oliveira, M. B. P. P. (2002). Influence of Olive Storage Period on Oil Quality of Three Portuguese Cultivars of *Olea europaea*, Cobrançosa, Madural, and Verdeal Transmontana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6335-6340.
- Pereira, A. P.; Pereira, J. A.; Bento, A.; Estevinho, M. L. (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2895-2902.

- Pereira, J. A.; Pereira, A.P.; Ferreira, I.C.F.R.; Valentão, P.; Andrade, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A. (2006). Phenolics compounds, antioxidant potential and microbial activity of table olives from Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8425-8431.
- Peres, A. M.; Baptista, P.; Malheiro, R.; Dias, L. G.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2011). Chemometric classification of several olive cultivars from Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) using artificial neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **105**, 65-73.
- Psani, M.; Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 1329-1336.
- Quintana, M. O. D.; Barranco, C. R.; García, P. G.; Balbuena, M. B.; Fernández, A. G. (1997). Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. *Grasas y Aceites*, **48**, 297-311.
- Regulamento (CEE) N° 2081/92 do Conselho. “Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior”. <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName.html?denomination Id=112>. Acedido a 20 de Fevereiro de 2012.
- Regulamento (CEE) N° 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991R2568:20110401:PT:PDF>. Acedido a 11 de Junho de 2012.
- Rejano, L.; Montañó, A; Casado, F. J.; Sánchez, A. H.; Castro, A. (2010). Table Olives: Varieties and Variations. *Food Biotechnology Department*, Instituto de la Grasa CSIC, Seville (Spain), **1**, 5-15.
- Rencher, A.C. (1995). *Methods of multivariate analysis*. New York: Wiley.
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J. L.; Fernández-Bolaños, J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 483-490.
- 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**, 604-612.
- Rodríguez-Gómez, F.; Bautista-Gallego, J.; Romero-Gil, V.; Arroyo-López, F. N.; Garrido-Fernández, A.; García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish

- green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, **46**, 56-63.
- Romero, C.; Brenes, M.; Yousfi, K.; Garcia, P.; Garcia, A.; Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 479-484.
- Sakouhi, F.; Harrabi, S.; Absalon, C.; Sbei, K.; Boukhchina, S.; Kallel, H. (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, **108**, 833-839.
- Soler-Rivas, C.; Espín, J. C.; Wichers, H. J. (2000). Review - Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013-1023.
- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 8533-8538.
- Sousa, A.; Ferreira, I.C.F.R. ; Barros, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “Alcaparras”. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 739-745.
- Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Malheiro, R.; Oliveira, M. B. P. P.; Pereira, J. A. (2011). Chemical Characterization of “Alcaparras” Stoned Table Olives from Northeast Portugal. *Molecules*, **16**, 9025-9040.
- Strauss, M.C.A.; Jolly, N.P.; Lambrechts, M.G.; Reuburg, V. P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 182-190.
- Tofalo, R.; Schirone, M.; Perpetuini, G.; Suzzi, G.; Corsetti, A. (2012a). Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*, **23**, 356-362.
- Tofalo, R.; Schirone, M.; Perpetuini, G.; Angelozzi, G.; Suzzi, G.; Corsetti, A. (2012b). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie van Leeuwenhoek*, **102**, 121-131.
- Ünal, K.; Nergizb, C. (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, **54**, 71-76.

- Vinha, A. F.; Ferreres, F.; Silva, B. M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J. A.; Oliveira, M. B. P. P.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influence of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, **89**, 561-568.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Elsevier Science, Part IV, pp 77-100.
- Whittenbury, R. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*, **35**, 13-26.