



**VI Simpósio
Nacional de
*Olivicultura***

Mirandela 2012

Editores:

Albino Bento
José Alberto Pereira



FICHA TÉCNICA

Título: VI Simpósio Nacional de Olivicultura

Coleção: Actas Portuguesas de Horticultura, n.º 21

Propriedade e edição: Associação Portuguesa de Horticultura (APH)

Rua da Junqueira, n.º 299, 1300-338 Lisboa

Tel. 213623094

<http://www.aphorticultura.pt/>

Autores: vários

Editores: Albino Bento e José Alberto Pereira

Revisão editorial: Maria Elvira Ferreira

Grafismo da capa: Francisco Barreto

Tiragem: 200 exemplares

ISBN: 978-972-8936-12-9

Qualidade microbiológica de azeitonas de mesa provenientes de produtores artesanais de Trás-os-Montes

F. Nogueira, P. Mendes, J.A. Pereira & E.L. Pereira

Centro de Investigação de Montanha (CIMO)/Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta Apolónia, Apt. 1172, 5301-854 Bragança, Portugal. epereira@ipb.pt

Resumo

As azeitonas de mesa são um alimento importante da dieta Mediterrânica, e devido à sua composição química, um elevado teor em compostos fenólicos, algumas vitaminas e uma gordura maioritariamente monoinsaturada, são-lhe atribuídos diferentes benefícios para a saúde. Em Portugal, a elaboração de azeitonas de mesa tem uma larga tradição, sobretudo nas regiões do interior, onde Trás-os-Montes se insere, representando uma fonte económica importante para os produtores tradicionais. Nestes produtores, as azeitonas são geralmente comercializadas a granel e por isso sujeitas a contaminações microbianas, podendo constituir um risco para a saúde dos consumidores.

O presente trabalho pretendeu avaliar a qualidade microbiológica de azeitonas de mesa obtida de produtores artesanais da região. Para o efeito, recolheram-se 8 amostras em condições de assepsia de diferentes produtores e avaliaram-se os seguintes parâmetros microbiológicos: microrganismos mesófilos totais, leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e esporos de clostrídios sulfito redutores. Na polpa de azeitona a população de mesófilos variou de 1×10^2 a 6×10^4 e a de leveduras de 2×10^2 a 6×10^5 UFC/g; enquanto na salmoura oscilou de 9×10^2 a 2×10^5 e de 8×10^2 a 1×10^6 UFC/mL, respetivamente. Nenhuma das amostras analisadas revelou a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal, bem como microrganismos patogénicos, como sejam *S. aureus* e *Salmonella* spp.. Estes resultados sugerem que as azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes são processadas em boas condições de higiene não apresentando perigos microbiológicos para a segurança do consumidor.

Palavras-chave: Azeitona de mesa, fermentação natural, segurança alimentar, microrganismos patogénicos.

Abstract

Microbiological quality of table olives from Trás-os-Montes artisan producers.

Table olives are an important food of the Mediterranean diet, and due to its chemical composition, a high content in phenolic compounds, some vitamins and a mostly monounsaturated fat, they have different health benefits. In Portugal, table olives elaboration has a long tradition and represents an economic source for the producers in Trás-os-Montes. These producers usually sold in bulk the olives and therefore they are subject to microbial contamination which can cause health danger to consumers.

The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of table olives obtained from regional artisan producers. For this purpose, 8 samples were

collected aseptically from different producers and evaluated the following microbiological parameters: total mesophilic microorganisms, yeasts, total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and spores of sulfite-reducing clostridia. In the olive pulp mesophilic population ranged from 1×10^2 to 6×10^4 and yeast 2×10^2 to 6×10^5 CFU/g; while brine varied from 9×10^2 to 2×10^5 and 8×10^2 to 1×10^6 CFU/mL, respectively. No samples analyzed were positive either for the microorganisms indicators of fecal contamination or for pathogens, including *S. aureus* and *Salmonella* spp.. These results suggest that Trás-os-Montes table olives are processed in good hygienic conditions not showing microbiological hazards for consumer safety.

Keywords: olive table, natural fermentation, food safety, pathogens microorganisms.

Introdução

As azeitonas de mesa são um alimento produzido e consumido sobretudo na região Mediterrânica e devido à sua composição química, um elevado teor em compostos fenólicos, algumas vitaminas e uma gordura maioritariamente monoinsaturada, são-lhe atribuídos diferentes benefícios para a saúde. Em Portugal, a elaboração de azeitonas de mesa tem uma larga tradição, sobretudo nas regiões do interior, onde Trás-os-Montes se insere, representando uma fonte económica importante para os produtores tradicionais. Nestes produtores, as azeitonas são geralmente comercializados a granel e por isso sujeitas a contaminações microbianas, podendo constituir um risco para a saúde dos consumidores.

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, podendo, no caso de azeitonas fermentadas e conservadas, detetar-se microrganismos que estão envolvidos no processo de fermentação, nomeadamente as *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas e leveduras (Arroyo-López et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2011; Panagou et al., 2008).

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu avaliar a qualidade microbiológica de azeitonas de mesa, obtidas por fermentação natural, de produtores artesanais da região de Trás-os-Montes.

Material e Métodos

As amostras de azeitonas de mesa foram obtidas na fase final de fermentação diretamente de 3 produtores artesanais da região de Trás-os-Montes. Os dados referentes ao local de origem, ano de colheita e tipo de azeitonas encontram-se no quadro 1. As amostras, num total de 8, foram recolhidas em condições de assepsia, usando um frasco esterilizado, e transportadas para o laboratório em mala térmica a uma temperatura de 4°C. Cada amostra foi subdividida em 2 subamostras (polpa de azeitona e salmoura) através da medição de 25 mL da solução de salmoura e da pesagem de frutos suficientes para a obtenção de 25 g de polpa de azeitona, seguida de homogeneização em 225 mL de água peptonada. Os parâmetros microbiológicos analisados foram os mesófilos, de acordo com a norma ISO 4833:2003; leveduras, através do meio *Potato dextrose agar* (PDA) com adição de 100 mg/mL de cloranfenicol (Oxoid, Cambridge, UK); esporos de clostrídios sulfite redutores de

acordo com a norma NP-2262:1996; coliformes totais e *E. coli* através do método SimPlate® (método oficial AOAC 2005.03); *Staphylococcus aureus* de acordo com a norma NP 4400-1:2002; *Salmonella* spp. através do Kit 1-2 Test da Biocontrol® (método oficial AOAC 989.13).

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.

Resultados e Discussão

Nos quadros 2 e 3 encontram-se os resultados da análise microbiológica realizadas na polpa de azeitona e salmoura, respetivamente

De uma forma geral, a população de microrganismos mesófilos foi mais elevada na salmoura do que na polpa de azeitona (quadros 2 e 3). Assim, as contagens obtidas na polpa de azeitona situaram-se entre 1×10^2 e 6×10^4 UFC/g, enquanto na salmoura oscilou 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. (2012) 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 de 1×10^6 UFC/mL (6 log UFC/ml) para as amostras 1 e 3 de salmoura (quadro 3). 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.

Os valores mais elevados de leveduras comparativamente aos mesófilos na polpa de azeitonas e salmoura 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), enquanto as bactérias lácticas, maioritariamente mesófilas, são inibidas em meios com concentração de NaCl superior a 8% (Quintana et al., 1997).

A presença de leveduras durante o processo de fermentação podem, segundo Psani & Kotzekidou (2006), ser úteis para fins de controlo biológico, pois não são microrganismos patogénicos pelo facto de não produzirem esporos ou micotoxinas, e podem produzir compostos voláteis e metabolitos que melhoram as características sensoriais do produto. Porém, uma produção excessiva de leveduras (> 7 log UFC mL⁻¹) pode ter efeitos negativos como uma maior produção de CO₂, que pode penetrar nas azeitonas e danificá-las (Fernández Díez et al., 1985), formação de outros gases, amolecimento da polpa, abaulamento dos pacotes onde são embaladas, turvação das salmouras ou produção de odores e sabores indesejáveis (Arroyo-López et al., 2008; Tofalo et al., 2012). Para além disto, a presença excessiva de leveduras nos alimentos poderá também 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.

Nas análises efetuadas à polpa de azeitona e à salmoura, não foram contabilizadas colónias viáveis de coliformes totais e *E. coli*, à semelhança do observado por Pereira et al. (2008) na polpa e 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. Assim, os resultados obtidos sugerem boas condições de higiene ao longo do processamento das azeitonas, uma vez que estes microrganismos são considerados indicadores de contaminação fecal.

No presente trabalho, não foram detetados esporos de clostrídios sulfito redutores 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 em alimentos, anaeróbios e esporulados, 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.

Nas amostras analisadas, não foram detetadas colónias viáveis de *S. aureus* bem como presença de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra. De acordo com Hernández et al. (2007) e Tofalo et al. (2012), 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 patogénicos, neste produto alimentar.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho sugerem que as azeitonas de mesa provenientes de produtores artesanais da região de Trás-os-Montes apresentam elevada qualidade microbiológica, sugerindo boas condições de higiene ao longo do processo de fermentação natural, visto que não foram detetados microrganismos indicadores de contaminação fecal bem como microrganismos patogénicos, nomeadamente *S. aureus* e *Salmonella* spp..

Agradecimentos

Trabalho financiado no âmbito do Projeto SUB-IOC-TEC 11/12 "Table olives from the northeast of Portugal: Contribution for their characterization and promotion"

Referências

- Alves, M., Gonçalves, T. & Quintas, C. 2012. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives fermentations. *Food Control*, 23:363-368.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Fernández Díez, M.J., Castro y Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., González Pellisó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M.I., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M.C., Sánchez Roldán, F., García García, P. & Castro Gómez-Millán, A., 1985. *Biología de la Aceituna de Mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Gráficas Urpe, Madrid (España).
- 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.
- 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.
- 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) 3034, 1987. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Suzzi, G. & Corsetti, A. 2012. 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.

Quadro 1 - Caracterização das amostras em estudo

Amostras	Origem geográfica	Tipo de Azeitonas	Ano de colheita
1	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas pretas	2008/2009
2	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas verdes	2008/2009
3	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas mistas	2009/2010
4	Mirandela	Azeitonas verdes	2009/2010
5	Mirandela	Azeitonas mistas	2009/2010
6	Vale de Gouvinhas, Mirandela	Azeitonas mistas retalhadas	2009/2010
7	Lilela, Valpaços	Azeitonas verdes	2009/2010
8	Mirandela	Azeitonas verdes	2009/2010

Quadro 2 - 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>	<i>Salmonella</i>
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

Quadro 3 - Contagens de microrganismos em amostras de salmoura (UFC/mL)

Amostra	Mesófilos	Leveduras	Coliformes	<i>E. coli</i>	Esporos clostrídios	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
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

