

**Evolução da população microbiana ao longo do  
processo de fermentação natural de azeitonas de mesa  
da cultivar Negrinha de Freixo**

**Ana Maria Rêgo Borges**

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

Orientado por

**Prof. Doutora Ermelinda Lopes Pereira  
Prof. Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista**

**Bragança  
2013**



Trabalho realizado no âmbito do Projeto:

SUB-IOC-TEC 11/12 “Table olives from the Northeast of Portugal: Contribution for their characterization and promotion”



*Aos meus Pais e Irmãs*

*Ao Diogo*



## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ermelinda Pereira por todo o auxílio prestado e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho, pela sua disponibilidade, por toda a motivação, conselhos e todo o apoio fornecidos. Pela sua paciência.

Agradecer também à minha Co-orientadora Professora Doutora Paula Baptista, por toda a disponibilidade e por todos os conhecimentos e conselhos dados e por toda a ajuda disponibilizada.

À Adega Cooperativa de Freixo de Espada à Cinta (Engenheiro Teófilo Ferreira) pelas amostras fornecidas para a realização de todo o trabalho, e por toda a disponibilidade demonstrada, sempre que surgisse uma dúvida.

À Fátima por todo o apoio, ajuda e incentivo, em especial, pela ajuda na parte da identificação molecular, e por todos os conhecimentos transmitidos. Agradeço também à Teresa, pela constante motivação e apoio.

Ao Nuno por toda a ajuda e auxílio prestado no laboratório, e por todas as explicações e esclarecimentos dados. Ao Ricardo por todas as explicações.

À Stefanie por todo o apoio, ajuda, incentivo e boa disposição. Por estar sempre lá, e nos momentos mais difíceis conseguir arranjar maneira de nos animar.

À Andreia por todo o carinho, amizade e boa disposição transmitida e por todos os momentos vividos ao longo destes anos.

Ao Diogo, por ser quem é! Por toda a ajuda e auxílio nos momentos mais difíceis, pela sua constante ajuda, paciência, compreensão, incentivo e pelo apoio demonstrado no percurso deste trabalho. Pela sua paciência para comigo e por todos os seus conhecimentos. Pelo seu carinho, afeto e amor de todos estes anos.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família. Em especial aos meus pais que tudo fizeram para que chegasse até aqui e concluísse mais uma etapa do meu percurso académico, pelo seu constante apoio e amor. Às minhas irmãs que sempre me deram força para continuar e me animaram nos momentos mais difíceis. Aos meus avós pela força e incentivo, e pelo seu amor.



# Índice

Resumo .....	xv
Abstract.....	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1. Enquadramento e objetivos .....	3
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>5</b>
2. Introdução.....	7
2.1 Azeitona de mesa: Definição .....	7
2.2 Produção e Comercialização de azeitona de mesa.....	7
2.3 Azeitona de mesa da cv. Negrinha de Freixo .....	9
2.4 Métodos de processamento de azeitonas de mesa .....	12
2.5 Aspetos microbiológicos do processo de fermentação de azeitonas de mesa.....	14
2.5.1 Flora microbiana associada.....	15
2.5.2 Identificação molecular de leveduras.....	18
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>21</b>
3. Material e métodos .....	23
3.1 Amostragem.....	23
3.2 Avaliação de parâmetros químicos .....	24
3.3 Avaliação de parâmetros microbiológicos.....	25
3.3.1 Preparação das amostras para análise .....	25
3.3.2 Quantificação de microrganismos.....	25
3.3.3 Isolamento de leveduras.....	26
3.4 Caraterização morfológica e molecular dos isolados de leveduras .....	26
3.4.1 Caraterização morfológica .....	26
3.4.2 Caraterização molecular.....	27
3.5 Cálculos e tratamento estatístico.....	29

<b>CAPÍTULO 4</b> .....	31
4. Resultados e discussão .....	33
4.1 Evolução do pH e acidez titulável durante a fermentação .....	33
4.2 Variação da população microbiana na salmoura e polpa de azeitona durante a fermentação .....	34
4.3 Caracterização dos isolados de leveduras.....	41
4.3.1 Morfológica.....	41
4.3.2 Molecular .....	43
4.4 Evolução das espécies de leveduras durante a fermentação .....	46
4.5 Índices de diversidade.....	53
4.6 Similaridade da população de leveduras da salmoura e polpa de azeitona.....	55
4.7 Correlação entre os parâmetros químicos e a abundância de espécies .	56
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	59
5. Conclusão .....	61
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	63
6. Referências Bibliográficas.....	65

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Superfície de olival para azeitona de mesa e respetiva produção de azeitona por regiões, referente ao ano 2012.....	8
<b>Quadro 2</b> – Abundância (média $\pm$ desvio padrão) dos diferentes grupos de microrganismos na polpa de azeitona cv. Negrinha de Freixo, imediatamente antes de ser submetida ao processo fermentativo.....	35
<b>Quadro 3</b> - Caraterísticas morfológicas das leveduras isoladas na salmoura e na polpa de azeitona durante o processo fermentativo.....	42
<b>Quadro 4</b> – Espécies identificadas após comparação das sequências obtidas com as do banco de dados do GenBank, por meio do Blastn com a espécie de maior identidade (%)......	44
<b>Quadro 5</b> - Evolução e abundância de leveduras na salmoura ao longo do processo fermentativo.....	48
<b>Quadro 6</b> - Evolução e abundância de leveduras na polpa ao longo do processo fermentativo.....	49
<b>Quadro 7</b> – Índices de diversidade das espécies de leveduras presentes na salmoura, ao longo do período fermentativo. ....	54
<b>Quadro 8</b> - Índices de diversidade das espécies de leveduras presentes na polpa de azeitona, ao longo do período fermentativo .....	55
<b>Quadro 9</b> - Índices de similaridade das espécies de leveduras presentes na salmoura e na polpa de azeitona, ao longo do processo fermentativo. ....	56
<b>Quadro 10</b> - Correlação de Spearman entre os parâmetros químicos avaliados na salmoura (pH e acidez titulável) e a abundância de cada espécie, abundância total e riqueza total .....	57



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Área geográfica da DOP Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo (adaptado do caderno de especificações).....	10
<b>Figura 2</b> – Embalagens comercializadas da Azeitona Negrinha de Freixo. ....	11
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da região de rDNA, que contém as unidades repetitivas dos genes que codificam o RNA ribossômico nuclear. Os retângulos representam os genes com sequências conservadas, enquanto as linhas representam as regiões espaçadoras mais variáveis. ....	19
<b>Figura 4</b> - Vista geral dos tanques de fermentação e recolha de amostra.....	23
<b>Figura 5</b> - Características macroscópicas (forma, elevação e margem) de colónias de leveduras em meio sólido. (adaptado de <a href="http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&amp;func=displayfigure&amp;book_id=3&amp;fig_number=4&amp;chap_number=7">http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&amp;func=displayfigure&amp;book_id=3&amp;fig_number=4&amp;chap_number=7</a> ). ....	27
<b>Figura 6</b> - Evolução da acidez titulável e do pH (média ± erro padrão; n=3) durante a fermentação. As médias seguidas por letras diferentes, minúsculas para o valor de pH e maiúsculas para os valores de acidez titulável, diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.....	33
<b>Figura 7</b> - Evolução da população de mesófilos, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para mesófilos na polpa da azeitona e minúsculas para mesófilos na salmoura, diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação. ....	36
<b>Figura 8</b> - Evolução da população de bactérias lácticas, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para bactérias lácticas na polpa da azeitona e minúsculas para bactérias lácticas na salmoura, diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação. ....	38
<b>Figura 9</b> - Evolução da população de bolores, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para bolores na polpa da azeitona e minúsculas para bolores na salmoura, diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação. ....	39

<b>Figura 10</b> - Evolução da população de leveduras, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para leveduras na polpa da azeitona e minúsculas para leveduras na salmoura, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação. ....	40
<b>Figura 11</b> - Aspeto macroscópico das colónias de leveduras isoladas. ....	43
<b>Figura 12</b> - Árvore filogenética representando a relação entre a região ITS do rDNA das diversas espécies de leveduras identificadas. As sequências nucleotídicas foram alinhadas através do programa MegAlign (DNASTAR), pelo método de Clustal utilizando a tabela dos pesos residuais PAM250. O comprimento de cada par de ramos representa a distância entre cada par de sequências. A escala que se encontra sob a árvore mede a distância entre as sequências. A espécie <i>Mucor hiemalis</i> (Nº de acesso KC009126) foi utilizada como grupo externo ( <i>outgroup</i> ) que é próximo ao grupo estudado, mas ainda assim claramente distinto dele.....	45
<b>Figura 13</b> - Abundância relativa das espécies de leveduras identificadas na salmoura (A) e na polpa de azeitona (B) durante a fermentação. ....	51

## Resumo

A “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” é um produto de denominação de origem protegida (DOP), da região do Nordeste Transmontano, consumida após tratamento ou em salmoura.

Este trabalho pretendeu avaliar a evolução da população microbiana (mesófilos, bactérias lácticas, bolores e leveduras) ao longo do processo de fermentação natural, em salmoura, de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo. Pretendeu-se ainda identificar morfológicamente e molecularmente, através da amplificação termocíclica da região *internal transcribed spacer* (ITS) do rDNA nuclear, as espécies de leveduras presentes durante a fermentação e correlacionar a sua presença com os parâmetros químicos avaliados na salmoura (pH e acidez titulável).

Os resultados indicam que a fase inicial do processo de fermentação natural é conduzida maioritariamente por leveduras e numa fase posterior também por bactérias lácticas. A identificação de leveduras durante a fermentação permitiu registar um total de 1130 isolados na salmoura e de 1492 na polpa, pertencentes ao género *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Galactomyces* e *Rhodotorula*. As espécies mais abundantes na salmoura e polpa de azeitona foram *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* e *C. boidinii*. Ao longo do processo de fermentação registaram-se variações na população de leveduras predominando nos primeiros 4 dias *C. boidinii* na salmoura e *P. membranifaciens* na polpa, e a partir dos 17 dias *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* em ambas as matrizes. A diversidade de espécies de leveduras foi superior na salmoura face à polpa, durante todo o processo fermentativo, apresentando valores máximos a partir dos 44-54 dias. A dinâmica populacional das leveduras mostrou estar significativamente correlacionada com o valor de pH e acidez, em que decorre o processo fermentativo.

Espera-se que os resultados possam contribuir para a melhoria das condições de fermentação da “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”, permitindo o aumento da sua qualidade e, simultaneamente, da sua segurança.

**Palavras-chave:** Azeitonas de mesa; Negrinha de Freixo; fermentação; leveduras; identificação molecular; índices de diversidade; índices de similaridade.

## Abstract

The “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” is a product with protected designation of origin (PDO) of the northeastern region of Trás-os-Montes, generally consumed after treatment or in brine.

This study intends to assess the evolution of microbial population (mesophiles, lactic acid bacteria, yeasts and molds) during the natural fermentation process, in brine, of table olive cultivar “Negrinha de Freixo”. It is also intends to identify the yeast species present during the fermentation process, by using both morphological and molecular methods (sequencing of the ITS region of the nuclear rDNA), and correlate them with chemical parameters (pH and titratable acidity) of the brine.

The results indicate that the initial phase of the natural fermentation is driven mainly by yeasts and at later stage also by lactic acid bacteria. During the fermentation was identified a total of 1130 yeast isolates in brine and 1492 in the pulp belonging to the genera *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* and *Galactomyces*. The most abundant yeast species in the brine and olive pulp were *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* and *C. boidinii*. Yeast population was changed throughout the fermentation process. In the first 4 days, the most abundant species found on brine was *C. boidinii* and on olive pulp was *P. membranifaciens*. After 17 days of fermentation, *S. cerevisiae* and *C. tropicalis* were the most abundant on both brine and olive pulp. The diversity of yeast species was highest in the brine when compared to the olive pulp, throughout the fermentation process, showing the highest values after 44-54 days of fermentation. The yeasts population dynamics was showed to be significantly correlated with the pH and acidity values that occur during the fermentation process.

It is hoped that the results may contribute to the improvement of "Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo" fermentation, allowing the increase of their quality and, simultaneously, of their security.

**Keywords:** Table olives; Negrinha de Freixo; fermentation; yeasts; molecular identification; diversity indices; similarity indices.

# CAPÍTULO 1

---



## 1. Enquadramento e objetivos

A Azeitona de conserva da cultivar Negrinha de Freixo é um produto com importância económica e social na região do Nordeste Transmontano. Esta cultivar apresenta características únicas, pelas suas condições peculiares de produção, que a torna beneficiária da Denominação de Origem Protegida (DOP). No entanto, apesar da excelente qualidade reconhecida destas azeitonas de mesa, tanto quanto é do nosso conhecimento, estudos relativos à flora microbiana envolvida no processo de fermentação destas azeitonas de mesa são desconhecidos. Neste contexto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

1. Conhecer a dinâmica da população microbiana, em especial de fungos filamentosos (bolors), leveduras, microrganismos aeróbios mesófilos e de bactérias lácticas, durante o processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo, produzidas no Nordeste Transmontano;
2. Avaliar os parâmetros químicos (acidez titulável e pH) na salmoura e correlacionar com a evolução da flora microbiana durante a fermentação;
3. Caracterizar morfológicamente e molecularmente as espécies de leveduras isoladas, na polpa de azeitona e salmoura, durante o processo de fermentação natural.

O presente trabalho encontra-se organizado em 4 partes distintas. Na parte introdutória abordam-se aspetos relacionados com a azeitona de mesa, nomeadamente a produção, a comercialização e o processamento das mesmas, destacando-se a cv. Negrinha de Freixo. Além disso, abordam-se aspetos microbiológicos do processo de fermentação de azeitonas de mesa, referindo-se os principais microrganismos envolvidos. A seguir, no capítulo *Material e Métodos* descrevem-se as metodologias utilizadas na execução deste estudo e os métodos estatísticos aplicados. No capítulo dos *Resultados e Discussão* apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos e finalmente, na última parte (*Conclusão*), apresentam-se as principais conclusões do trabalho.



# CAPÍTULO 2

---



## 2. Introdução

### 2.1 Azeitona de mesa: Definição

Segundo a Norma Portuguesa – 3034 (2012), entende-se por “**Azeitonas de Mesa**”, o produto preparado a partir de frutos são das variedades cultivadas da oliveira (*Olea europaea* L.) que são escolhidas para a produção de azeitonas cujo volume, forma, relação polpa/caroço, características da polpa, firmeza e facilidade de desprendimento do caroço as tornam particularmente adequadas para processamento, de modo a remover o seu amargor e a torna-los edíveis. Estas são preservadas por fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem adição de conservantes, podendo ser embaladas com ou sem líquido de cobertura.

O Conselho Oleícola Internacional (COI) que é a entidade que a nível internacional regula o setor dos azeites e da azeitona de mesa considera a existência de três tipos de azeitonas de mesa, dependendo do seu estado de maturação. São assim consideradas: i) **azeitonas verdes**, as obtidas a partir de frutos colhidos durante o período de amadurecimento, apresentando a cor verde a amarelo-palha e que tenham atingido o tamanho normal; ii) **azeitonas mistas**, os frutos colhidos antes de atingirem a completa maturação, na altura da mudança de cor, podendo variar entre os tons rosados a acastanhados; iii) e **azeitonas pretas** correspondem aos frutos colhidos no momento em que atingiram a maturação completa ou ligeiramente antes da maturação, podendo variar a sua coloração entre o negro e vermelho, a castanho - escuro, passando por tons violáceos.

### 2.2 Produção e Comercialização de azeitona de mesa

Nas últimas duas décadas tem havido um crescimento progressivo na produção mundial de azeitonas de mesa, sendo estimada para a campanha de 2012/2013 uma produção de cerca de 2 315 000 toneladas (COI, 2012). Prevê-se que os estados membros da união europeia (EU-27) sejam responsáveis por 30% desta produção mundial, com Espanha a liderar com 450 000 t, seguido da Grécia (130 000 t), Itália (74 000 t), Portugal (8 000 t), Chipre (2 800 t) e França (1 200 t) (COI, 2012). A Turquia ocupa a segunda posição no ranking mundial, com produções médias anuais na ordem

dos 11%, seguindo-se-lhe o Egito (9%), Síria (8%), Estados Unidos da América (7%), Marrocos (6%), Argélia e Argentina (4% cada) (COI, 2012).

Em Portugal Continental, a principal região produtora de azeitona de mesa é o Alentejo, com uma produção média em 2012 de 7 615 t, seguida da região Norte com 3 208 t (Estatísticas Agrícolas, 2012). No entanto, a área cultivada de olival destinado à produção de azeitona de mesa é maior na região Norte relativamente ao Alentejo (Quadro 1).

De acordo com o Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agro-Alimentares (2010), Trás-os-Montes é a principal região produtora de azeitonas de mesa, nomeadamente a região de Freixo de Espada à Cinta.

**Quadro 1** - Superfície de olival para azeitona de mesa e respetiva produção de azeitona por regiões, referente ao ano 2012.

<b>Região</b>	<b>Superfície (ha)</b>	<b>Produção (t)</b>
<b>Norte</b>	3 686	3 208
<b>Centro</b>	1 534	1 008
<b>Lisboa</b>	26	28
<b>Alentejo</b>	3 252	7 615
<b>Algarve</b>	232	114
<b>Continente</b>	8 730	11 973

Fonte: Estatísticas Agrícolas. (2012).

No que respeita à comercialização de azeitona de mesa, na Europa, para a campanha de 2012/2013, estima-se que a importação deste produto ronde as 583 000 t, ao passo que a exportação ande à volta das 625 000 t (COI, 2012). Relativamente ao consumo, este será por volta de 2 520 000 t (COI, 2012).

Relativamente à comercialização de azeitona de mesa, em Portugal, registou-se no ano de 2012 uma importação deste produto na ordem das 7 470 t e uma exportação de 772 t, correspondendo a um valor transacionado de 3 902 000 euros e 1 668 000 euros, respetivamente (Estatísticas Agrícolas, 2012).

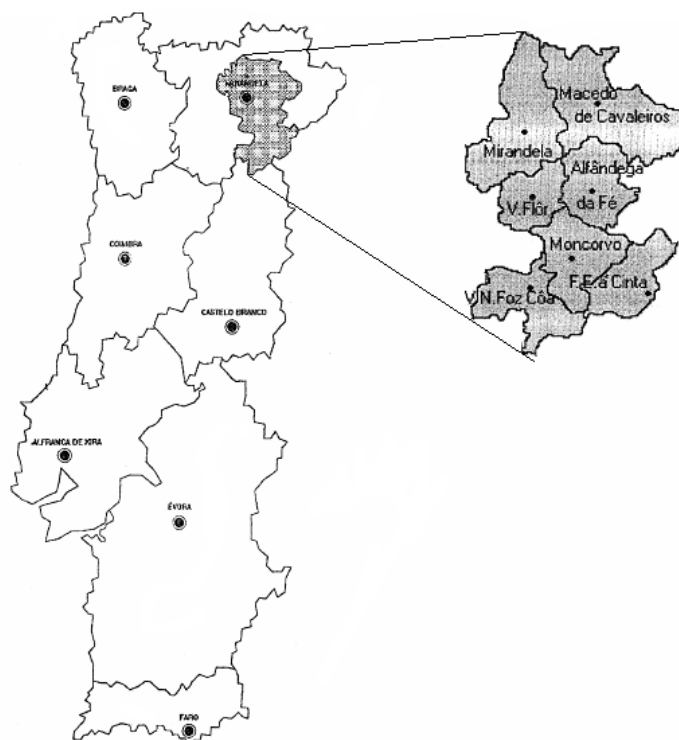
### **2.3 Azeitona de mesa da cv. Negrinha de Freixo**

Em Portugal, foram criadas até ao momento duas Denominações de Origem Protegida (DOP) para a azeitona de mesa, designadamente, a “Azeitona de Conserva de Elvas e Campo Maior” e a “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”.

A DOP “Azeitona de Conserva de Elvas e Campo Maior”, é processada com azeitonas das cultivares Azeiteira, Carrasquenha, Redondil e Conserva de Elvas, tendo a sua área de produção delimitada aos concelhos de Elvas e Campo Maior (Regulamento CEE n.º 2081/92).

A DOP “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”, protegida pelo Regulamento (CE) n.º 1107/96, é processada a partir da cultivar Negrinha de Freixo. De acordo com o Despacho 47/94, o qual também reconheceu a Denominação de Origem, a área geográfica de produção está circunscrita aos concelhos de Vila Nova de Foz Côa, Freixo de Espada à Cinta, Torre de Moncorvo, Alfândega da Fé, Vila Flor, Mirandela e Macedo de Cavaleiros (Figura 1).

Desde 1 de Janeiro de 2011, a Adega Cooperativa de Freixo de Espada à Cinta é o órgão responsável pela gestão da DOP “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”, tendo assinado um acordo de transferência de responsabilidades com o anterior detentor, a Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Moncorvo, CRL. Esta informação encontra-se publicada no Diário da República, 2.ª série n.º 209, 31 de Outubro de 2011 (Aviso n.º 21543/2011).



**Figura 1** - Área geográfica da DOP Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo (adaptado do caderno de especificações).

De acordo com as normas de produção de azeitona de Conserva Negrinha de Freixo, na preparação deste tipo de azeitonas de mesa deverão ser utilizados frutos inteiros, sãos, em estado de maturação apropriado, com forma arredondada, lisa, terminando em ligeiro bico e consistência firme, isentos de defeitos e de matérias estranhas. A cor do fruto deverá variar de verde amarelada a negro violáceo, dependendo do tipo de maturação, o peso deverá situar-se entre 3 e 5 gramas em média e o volume entre 3 a 5 cm<sup>3</sup> (caderno de especificações).

Em relação à colheita dos frutos, esta deverá ser feita manualmente e, posteriormente, os frutos sujeitos à calibração, uma vez que apenas são 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).

Dependendo do tratamento aplicado poderão ser obtidas três tipos de Azeitonas de Conserva Negrinha de Freixo: i) **azeitonas do tipo verde**, preparadas em salmoura, sendo os frutos colhidos de cor verde a verde amarelada e tratados com solução diluída de hidróxido de sódio de 1,5 a 2,5%; após lavagem com água são colocados em salmoura, processo onde se produz a fermentação láctica; ii) **azeitonas negras tratadas**, obtidas a partir de frutos não totalmente maduros, colhidos na mudança da cor

verde para negro violáceo e enegrecidos por oxidação, sendo o amargo eliminado por um ou vários tratamentos com hidróxido de sódio; iii) e **azeitonas maduras em salmoura**, produzidas a partir de frutos colhidos em plena maturação ou pouco antes, apresentando uma cor violácea uniforme, sendo colocados em salmoura, com uma concentração de sal entre 8 a 10% onde ocorre a fermentação, durante 6 a 9 meses, até perderem o sabor amargo (caderno de especificações).

Após o processo de fermentação, a azeitona deve apresentar-se em salmoura, acondicionada em embalagem de vidro, lata, plástico ou outro material inerte e inócuo, próprio para este género alimentício (Figura 2). O peso máximo das embalagens não poderá ultrapassar os 15 kg de peso escorrido. Quando as embalagens são de lata, a folha terá de ser revestida de verniz próprio para géneros alimentícios e resistente às salmouras (caderno de especificações).



**Figura 2** – Embalagens comercializadas da Azeitona Negrinha de Freixo.

## 2.4 Métodos de processamento de azeitonas de mesa

Os tratamentos tecnológicos para obtenção de azeitonas de mesa têm como principal objetivo a remoção do amargo natural dos frutos, atribuído maioritariamente à oleuropeína, que é o composto fenólico mais abundante nas azeitonas não processadas (Soler-Rívas *et al.*, 2000; Parinos *et al.*, 2007).

De entre os vários tratamentos, os que apresentam maior importância a nível mundial são o Sevilhano ou Espanhol (azeitonas verdes), o Californiano ou Americano (azeitonas pretas oxidadas) e o Grego (de fermentação natural) (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Dabbou *et al.*, 2012; Ghanbari *et al.*, 2012; Tofalo *et al.*, 2012a).

O método utilizado para a produção de azeitona de mesa varia muito de acordo com a região, sendo de salientar, que a fermentação natural das azeitonas é o processo mais comum e também o mais utilizado na região de Trás-os-Montes.

No método de preparação de **Fermentação Natural (Estilo Grego)**, as azeitonas depois de colhidas são lavadas e colocadas em salmoura com uma concentração de sal (NaCl) entre 8% a 10% (Tassou *et al.*, 2002; Rejano *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011). De acordo com a região de produção, a concentração de sal adicionada à salmoura, pode ser ligeiramente inferior (6%) (Nychas *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006). Seguidamente inicia-se o processo de fermentação natural e espontânea, que é conduzida maioritariamente por leveduras, mas também por bactérias lácticas e bactérias Gram-negativo (Fernández *et al.* 1997; Nout e Rombouts, 2000; Panagou *et al.*, 2011). Esta flora microbiana é determinada pela disponibilidade de substratos fermentáveis, do conteúdo em sal, do pH e da temperatura, bem como das condições de anaerobiose ou aerobiose utilizadas e dos compostos antimicrobianos presentes, como os compostos fenólicos (Nychas *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012b). Numa fermentação bem sucedida a microbiota final será constituída apenas por leveduras e bactérias lácticas, e a proporção entre as duas populações é determinante nas características do produto final (Nisiotou *et al.*, 2009). Este processo de fermentação natural ocorre durante um longo período de tempo (em geral 8-12 meses). Esse facto deve-se sobretudo à lenta difusão dos compostos fermentáveis. Os açúcares difundidos na salmoura durante o processo fermentativo são utilizados pelos microrganismos e convertidos em ácidos orgânicos, nomeadamente o ácido láctico, o ácido acético e o ácido málico. No final do processo fermentativo, as azeitonas devem apresentar um valor de pH de 4,5 e uma acidez inferior a 0,6% (Hutkins, 2006), e podem ainda manter

um ligeiro amargor, devido essencialmente à presença de polifenóis residuais (Barranco *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Kanavouras *et al.*, 2005; Cabezas, 2011; Panagou *et al.*, 2011). De acordo com o estado de maturação do fruto, as azeitonas obtidas por este processo de fermentação natural podem designar-se por "verdes ao natural", "mistas ao natural" ou "pretas ao natural" (Norma Portuguesa, 2012). No caso das azeitonas pretas ao natural, no fim do processo de fermentação as azeitonas são oxidadas pela sua exposição ao ar para haver uma melhoria da sua aparência e cor (Fernández *et al.*, 1997).

Após o processo fermentativo, as azeitonas podem ser embaladas numa nova salmoura apropriada, para serem comercializadas (Fernández *et al.*, 1997). A sua conservação é garantida mediante processos de pasteurização ou esterilização do produto (Cabezas, 2011), ou ainda pela adição de conservantes, como o sorbato de potássio ou sorbato de sódio (Fernández *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2006).

Nas **Azeitonas verdes (Estilo Espanhol ou Sevilhano)**, as azeitonas são colhidas quando atingem uma cor verde-amarelada, sendo depois submetidas a um tratamento anaeróbio com uma solução de 2 a 5% de hidróxido de sódio (NaOH), durante algumas horas (Parinos *et al.*, 2007). Este tratamento com NaOH permite a remoção do amargor e da adstringência da azeitona, pela degradação dos compostos fenólicos (principalmente oleuropeína) em hidroxitirosol (Fernández *et al.*, 2005). A concentração adequada de NaOH a usar depende de vários fatores, tais como: temperatura, cultivar e grau de maturação dos frutos aquando do momento da colheita (Fernández *et al.*, 1997).

Após o tratamento alcalino as azeitonas são lavadas repetidamente com mudanças de água, por períodos de tempo variáveis, durante aproximadamente 24 horas (Castro e Brenes, 2001). De seguida, as azeitonas são colocadas em salmoura com uma concentração de NaCl de aproximadamente 10%, onde se inicia uma fermentação láctica (Gómez *et al.*, 2006). A duração da fermentação depende essencialmente das características do tratamento alcalino prévio, da cultivar, da temperatura e da população microbiana existente no meio (Fernández *et al.*, 1997). A fermentação caracteriza-se por ocorrer em 3 fases distintas em que os microrganismos se vão sucedendo (Fernández *et al.*, 1997). Na fase inicial ocorrem as bactérias Gram-negativo e numa segunda fase surgem as bactérias ácido-lácticas e leveduras e, finalmente, na terceira fase, verifica-se um crescimento abundante de *Lactobacillus* e em menor abundância de algumas espécies de leveduras (Panagou *et al.*, 2006).

Este tipo de azeitonas tem diversas apresentações comerciais, desde inteiras, descaroadas e recheadas com diversos ingredientes.

Em relação ao processamento de **Azeitonas pretas oxidadas**, também conhecidas por **Estilo Californiano ou Americano**, as azeitonas utilizadas são colhidas quando a sua cor está a começar a mudar, antes de atingir a sua plena maturação (Rejano *et al.*, 2010). Este método envolve três passos: tratamento alcalino, armazenamento em salmoura e preservação (Garcia *et al.*, 1992). Após a colheita, as azeitonas são tratadas com três a cinco soluções de hidróxido de sódio (1% a 2%), por períodos de tempo variável, para conseguir uma penetração progressiva do NaOH desde a polpa até ao caroço (Fernández *et al.*, 1997). No fim de cada tratamento alcalino as azeitonas são lavadas com água, à qual é injetado ar sob pressão. Este tratamento alcalino aeróbio permite o escurecimento progressivo tanto da pele como da polpa do fruto, devido à oxidação de orto-difenóis como o hidroxitirosol e o ácido cafeico (Brenes *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1992). Depois de obtida a cor desejada das azeitonas, estas continuam a ser lavadas e arejadas até se atingir aproximadamente um pH de 8 (Marsilio *et al.*, 2001). Posteriormente é adicionado à última água de lavagem, 0,1% de gluconato ferroso para estabilizar a cor alcançada na oxidação. Finalmente as azeitonas são escolhidas e classificadas de acordo com o calibre dos frutos. As azeitonas são seguidamente embaladas numa salmoura contendo 3% de NaCl e entre 10 - 40 ppm de ferro, e como o produto final, independentemente da sua forma de apresentação, é um alimento de baixa acidez, deve ser conservado mediante esterilização ou pela adição de ácidos, como ácido láctico ou ácido glucónico (Fernández *et al.*, 1997).

## **2.5 Aspetos microbiológicos do processo de fermentação de azeitonas de mesa**

A flora autóctone microbiana associada às azeitonas desempenha um papel fundamental no processo fermentativo. Dela está dependente as características do produto final, como o aroma e o sabor, bem como a qualidade apresentada (Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Dabbou *et al.*, 2012; Tofalo *et al.*, 2012a).

Ao longo do processo de fermentação das azeitonas a predominância de uma população microbiana em detrimento de outras depende de vários fatores tais como a

concentração de sal, o pH da salmoura, o oxigénio disponível, a capacidade de difusão dos nutrientes do fruto para a salmoura, a presença de ácidos orgânicos e a temperatura de fermentação (Nisiotou *et al.*, 2009; Arroyo-López *et al.*, 2012), pois nem todos os microrganismos toleram as mesmas condições.

Como referido anteriormente, os microrganismos são fundamentais para a produção de azeitona de mesa, estando diversos grupos envolvidos nesse processo (Arroyo-López *et al.*, 2012): as bactérias Gram-negativo, as leveduras e as bactérias lácticas são os mais relevantes (Fernández *et al.*, 1997).

Assim, a identificação da microbiota que ocorre durante o processo fermentativo é de extrema importância, pois permite conhecer de uma forma mais clara o papel de cada microrganismo, bem como justificar as alterações ocorridas ao longo de todo o processo de fermentação.

### 2.5.1 Flora microbiana associada

As bactérias **ácido-lácticas** são bactérias Gram-positivo com necessidades nutricionais complexas que crescem apenas em meios ricos em nutrientes. *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*, são as principais espécies envolvidas no processo de fermentação das azeitonas (Fernández *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2004; Campaniello *et al.*, 2005). Contudo, foi referido a presença de outras espécies tais como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* e *Enterococcus spp.*, no processo de fermentação de azeitonas verdes não tratadas com NaOH (Randazzo *et al.*, 2004). Estas espécies desempenham um papel importante no processo de fermentação das azeitonas, devido à sua capacidade de produzir ácido láctico e compostos antimicrobianos (bacteriocinas). Estes compostos promovem uma rápida acidificação da salmoura e inibem o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Arroyo-López *et al.*, 2012). Estes microrganismos são ainda responsáveis pela degradação da oleuropeína (Arroyo-López *et al.*, 2012).

As **leveduras** desempenham igualmente um papel importante na fermentação de azeitonas de mesa, em especial no processo de fermentação natural (Arroyo-López *et al.*, 2006). As espécies de leveduras dominantes na fermentação de azeitonas verdes pertencem maioritariamente, aos géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*,

*Rhodotorula*, *Saccharomyces* (Arroyo-López *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007; Arroyo-López *et al.*, 2008b; Hurtado *et al.*, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010).

De entre o género *Candida* as espécies mais frequentes são *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* durante a fermentação e armazenamento de azeitonas verdes nos EUA (Mrak *et al.*, 1956), *C. tropicalis* em azeitonas de mesa da cultivar Cobrançosa, processadas segundo o método de fermentação natural (Nogueira *et al.*, 2012b), e na salmoura de azeitonas das cultivares Gordal e Manzanilla (Bautista-Gallego *et al.*, 2011). *Candida boidinii* foi identificada em azeitonas pretas maduras (Arroyo-López *et al.*, 2006), na salmoura de azeitonas verdes (Arroyo-López *et al.*, 2008b), em azeitonas pretas francesas (Coton *et al.*, 2006) e ainda, em azeitonas espanholas da cultivar Arbequina (Hurtado *et al.*, 2008). Foi também identificada por Nogueira *et al.* (2012b) durante a fermentação de azeitonas de mesa da cultivar Cobrançosa, processadas de forma natural. Esta espécie apresenta capacidade lipolítica (Marquina *et al.*, 1992; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010), provocando um aumento da quantidade de ácidos gordos livres na salmoura. Espécies deste género são ainda capazes de sintetizar uma série de compostos bioativos que funcionam como antioxidantes (Abbas *et al.*, 2006). É exemplo dessa atividade a produção de carotenóides, tocoferóis e ácido cítrico (Abbas *et al.*, 2006).

No que concerne ao género *Pichia*, as espécies envolvidas e identificadas com maior frequência durante o processo fermentativo de vários tipos de azeitonas foram: *P. membranifaciens*, *P. anomala* e *P. guilliermondii* (Arroyo-López *et al.*, 2006; Tofalo *et al.*, 2012a). Foi detetada a presença de *P. membranifaciens* em diversos tipos de azeitonas pretas e verdes (Coton *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010), em azeitonas espanholas da variedade Arbequina (Hurtado *et al.*, 2008 e 2009) e em azeitonas de mesa da cultivar Cobrançosa (Nogueira *et al.*, 2012b). Este último autor identificou também a presença de *P. anomala*. A presença desta espécie foi também visível durante o processamento de azeitonas de mesa verdes em Portugal (Hernández *et al.*, 2007). *Pichia guilliermondii* foi detetada durante a fermentação de azeitonas verdes sicilianas (Aponte *et al.*, 2010).

De acordo com Schmitt e Breining. (2002) e Hernández *et al.* (2008), as espécies *P. anomala* e *P. guilliermondii* apresentam uma capacidade “Killer” que lhes permite produzir proteínas tóxicas que causam a morte a espécies mais sensíveis. A espécie *P. anomala* aumenta a produção de dióxido de carbono, que poderá penetrar nas azeitonas,

danificando-as (Fernández Díez *et al.*, 1985). Esta alteração foi relatada por Quintana *et al.* (1979) na fermentação de azeitonas pretas.

Do género *Rhodotorula*, as espécies detetadas com mais frequência na fermentação de azeitonas de mesa foram *R. glutinis*, *R. graminis* e *R. minuta* (Vaughn *et al.*, 1969). Algumas espécies deste género têm a capacidade de produzir enzimas que levam à degradação da parede celular dos frutos. Esta atividade foi descrita em *R. minuta* na fermentação de azeitonas verdes (Hernández *et al.*, 2007). Vaughn *et al.* (1969) referem a capacidade de *R. minuta*, *R. rubra* e *R. glutinis* em formarem biofilmes na salmoura e produzirem poligalacturonases que levam ao amolecimento e posterior degradação dos frutos.

Do género *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* é a espécie detetada com mais frequência, em processos de fermentação de azeitonas verdes (Arroyo-López *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2012), ou de azeitonas pretas (Arroyo-López *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010). Esta espécie pode ter um papel importante na conservação das azeitonas de mesa, protegendo o produto final da oxidação dos ácidos gordos insaturados (Hernández *et al.*, 2007). Contudo, Fernández Díez *et al.* (1985) referem efeitos indesejáveis para as azeitonas, quando presentes em quantidades superiores a 7 log UFC/mL, devido ao aumento de produção de dióxido de carbono, que pode penetrar nas azeitonas, danificando-as. Esta alteração foi relatada por Quintana *et al.* (1979) na fermentação de azeitonas pretas.

Relativamente ao género *Debaryomyces*, *D. hansenii* é a espécie mais frequente durante o processamento de azeitonas de mesa verdes em Portugal (Hernández *et al.*, 2007) e tem sido associada à produção de enzimas que degradam a parede celular das azeitonas (Hernández *et al.*, 2007), possuindo ainda uma capacidade “killer” (Hernández *et al.*, 2008).

Em Portugal, vários autores (Alves, 2010; Rodrigues, 2011; Silva *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2012b) têm feito estudos, tendo por base cultivares de azeitonas portuguesas (Manzanilha, Cordovil, Galega, Cobrançosa), com o intuito de conhecer a microbiota presente durante a fermentação. Nestes estudos, verificou-se que: as principais espécies de leveduras que ocorrem na salmoura durante a fermentação de azeitonas verdes, foram *P. anomala*, *Kuyveromyces marxianus*, *D. hansenii*, *C. boidinii*, *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae* (Rodrigues, 2011). Por sua vez, em azeitonas verdes temperadas, as espécies dominantes foram *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii* e *C. boidinii* (Rodrigues, 2011).

Além destas, foram identificadas *P. fermentans*, *S. cerevisiae* e *C. oleophila* em azeitonas de mesa das variedades Galega e Cordovil (Silva *et al.*, 2012), *Cryptococcus carnescens*, *C. fermentati*, *C. membranifaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces odoratus*, *P. kluyveri*, *P. guilliermondii*, *R. mucilaginoso*, *C. diddensiae*, *C. quercitrusa*, *C. boidinii*, *Zygorhynchus mrakii*, *P. galeiformis*, *S. cerevisiae*, *Citeromyces matritensis* e *C. oleophila* em azeitonas verdes britadas da variedade Manzanilha (Alves, 2010).

Na cultivar Cobrançosa foram identificadas *P. membranifaciens*, *Candida ishiwadae*, *Sporobolomyces roseus*, *Wickerhamomyces anomalus* (anteriormente designada *P. anomala*), *P. manshurica*, *C. boidinii*, *S. paradoxus*, *C. lipolytica* e *C. tropicalis* (Nogueira *et al.*, 2012b).

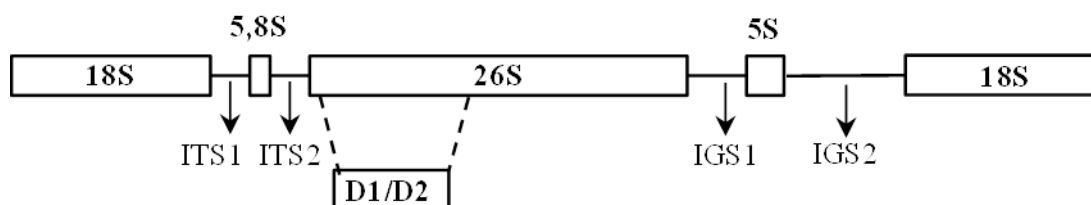
Contudo, em relação à cultivar Negrinha de Freixo, tanto quanto é do nosso conhecimento, desconhece-se a microbiota presente durante a fermentação.

## 2.5.2 Identificação molecular de leveduras

Até há alguns anos atrás, a classificação e identificação de leveduras baseava-se essencialmente em aspetos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Kurtzman *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1990). Contudo, estes métodos demonstraram não ser, muitas vezes, suficientemente viáveis e ser, por outro lado, trabalhosos e morosos. Recentemente, com o desenvolvimento e aplicação de métodos moleculares, a identificação de leveduras é feita com maior exatidão permitindo, deste modo, obviar muitos dos problemas inerentes à identificação de espécies pelos métodos convencionais (Arroyo-López *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2008; Aponte *et al.*, 2010).

A metodologia de identificação molecular de leveduras mais utilizada baseia-se na amplificação, recorrendo à reação da polimerase em cadeia (PCR), da região do DNA que contém o conjunto de genes que codificam o RNA ribossómico (rRNA), (Arroyo-López *et al.*, 2006; Kurtzman e Suzuki, 2010; Groenewald *et al.*, 2011; Giannino *et al.*, 2011). O conjunto de genes de rRNA existe em múltiplas cópias, encontrando-se alinhados em *tandem* (Martin e Rygiewicz, 2005). Cada unidade repetitiva do rDNA é constituída por (i) regiões codificantes conservadas, correspondentes aos três genes 18S, 5,8S e 26S; (ii) regiões não codificantes, que

correspondem aos espaçadores internos transcritos (ITS) e espaçadores intergênicos não transcritos (IGS), que separam as diferentes unidades de transcrição (Figura 3) (Martin e Rygiewicz, 2005). De entre as regiões codificantes, o gene 26S apresenta sequências menos conservadas face aos genes 18S e 5,8S.



**Figura 3** - Representação esquemática da região de rDNA, que contém as unidades repetitivas dos genes que codificam o RNA ribossômico nuclear. Os retângulos representam os genes com sequências conservadas, enquanto as linhas representam as regiões espaçadoras mais variáveis.

A identificação molecular de leveduras é efetuada recorrendo-se à região ITS, localizada entre os genes 18S e 26S do rRNA e que geralmente inclui também a região codificante do gene 5,8S do rRNA, ou recorrendo somente à região D1/D2 do 26S rRNA (Arroyo-López *et al.*, 2006; Kurtzman e Suzuki, 2010; Giannino *et al.*, 2011; Groenewald *et al.*, 2011). As diferenças na região ITS e D1/D2 são detetadas normalmente por sequenciação dos produtos amplificados (Arroyo-López *et al.*, 2006; Kurtzman e Suzuki, 2010; Giannino *et al.*, 2011; Groenewald *et al.*, 2011). São várias as razões que tornam estas duas regiões adequadas à identificação de leveduras: i) facilidade de amplificação por PCR, por surgirem em múltiplas cópias; ii) possuem um elevado polimorfismo interespecífico, sendo a variabilidade intra-específica muito reduzida; iii) e, finalmente, podem ser amplificadas com iniciadores nucleotídicos universais (Li, 1997). O par de iniciadores nucleotídicos frequentemente usados para amplificar a região ITS em leveduras é ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (Arroyo-López *et al.*, 2006). Para a amplificação da região D1/D2 são normalmente utilizados os iniciadores nucleotídicos universais NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) e NL4 (5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3) (Kurtzman e Robnett, 1998; Arroyo-López *et al.*, 2006). A região ITS, por permitir uma maior variabilidade entre espécies, foi indicada e aceite recentemente como “barcoding” (código de barras do DNA) de fungos (Schoch *et al.*, 2012).

As sequências obtidas são posteriormente comparadas com as presentes em bases de dados, como a disponibilizada pelo *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Este compara as sequências da região amplificada de acordo com a sua similaridade, com bases de dados de sequências disponíveis, fornecendo resultados de identificação de espécies bastante rápido (Kurtzman *et al.*, 1998).

# CAPÍTULO 3

---



### 3. Material e métodos

#### 3.1 Amostragem

As amostras utilizadas para a realização do presente trabalho foram recolhidas na região do Nordeste Transmontano, mais precisamente na adega Cooperativa de Freixo de Espada à Cinta, entre Novembro de 2012 e Março de 2013. Durante este período, foram recolhidas 19 amostras de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo, sendo todas produzidas segundo o método de fermentação natural. Em cada período de amostragem (0, 4, 17, 27, 32, 44, 54, 149 dias da fermentação) foi retirada uma amostra por tanque de fermentação, tendo-se amostrado um total de 3 tanques de fermentação (Figura 4). As amostras recolhidas (azeitonas e respetiva salmoura) foram colocadas em frascos de vidro estéreis de 2L e transportadas em arca térmica para o laboratório.

Na preparação da salmoura destas azeitonas utilizou-se água e sal (NaCl), a uma concentração entre 4,5 a 6% <sup>1</sup>. O processo de fermentação teve a duração aproximada de 5 meses, tendo o responsável informado que o produto estava pronto para comercialização ao fim desse tempo. No início do processo fermentativo adicionou-se, ainda, ácido acético, (3mL/kg de azeitona<sup>1</sup>) como regulador de acidez.



**Figura 4** - Vista geral dos tanques de fermentação e recolha de amostra.

As amostras recolhidas foram utilizadas para avaliar alguns parâmetros químicos (pH e acidez) e microbiológicos, nomeadamente a quantificação da população microbiana (bolores, leveduras, mesófilos totais e bactérias lácticas) e a caracterização da população de leveduras ao longo do processo de fermentação das azeitonas de mesa.

---

<sup>1</sup> Informação fornecida pelo responsável da Adega Cooperativa

### 3.2 Avaliação de parâmetros químicos

Os parâmetros químicos (acidez titulável e pH) foram determinados na salmoura nas diferentes datas de amostragem (0, 4, 17, 27, 32, 44, 54, 149 dias após a fermentação).

#### Acidez

A determinação da acidez titulável foi realizada em duplicado de acordo com a norma portuguesa NP-1421 (1977), com algumas alterações.

Após homogeneização da amostra, procedeu-se à sua filtração, utilizando papel de filtro Whatman N° 4. Do filtrado recolheu-se 25 mL para um balão de 250 mL perfazendo-se o volume com água destilada. Para desgaseificar a água, esta foi colocada previamente no ultra-sons durante 10 minutos. 25 mL desta solução foi em seguida, titulada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M, usando fenolftaleína a 2% como indicador.

A acidez foi expressa em percentagem de ácido láctico/100 mL de salmoura e foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{0,1 \times \text{volume de NaOH} \times \text{MM ácido láctico} \times 10}{\text{volume amostra}} \times 100$$

Sendo:

Volume amostra = 25 mL

MM (ácido láctico) = 90,08 g/mol

#### pH

A determinação do pH foi efetuada em triplicado por potenciometria. Antes de cada determinação o equipamento foi calibrado com soluções tampão comerciais de pH=7,01 e pH=4,01 à temperatura ambiente. Foi utilizado o potenciómetro com eléctrodo de penetração da marca Hanna HI 99163.

### **3.3 Avaliação de parâmetros microbiológicos**

#### **3.3.1 Preparação das amostras para análise**

Os parâmetros microbiológicos foram avaliados na polpa e na salmoura de 19 amostras de azeitonas de mesa ao longo do processo de fermentação, com o objetivo de estudar a flora microbiológica das azeitonas de mesa.

As amostras recolhidas nos tanques de fermentação foram subdivididas no laboratório em 2 sub-amostras: azeitonas e salmoura. Para obtenção da sub-amostra de salmoura retirou-se 10 mL da solução da amostra recolhida; e para a obtenção da sub-amostra das azeitonas pesaram-se 25 g de polpa de azeitona da amostra recolhida. A remoção do endocarpo (caroço) das azeitonas foi realizada com auxílio de um bisturi em condições de assepsia. As sub-amostras, salmoura e polpa de azeitona foram posteriormente homogeneizadas em 90 mL e 250 mL de água peptonada, respetivamente. Em seguida, efetuaram-se diluições decimais sucessivas em 9 mL de água peptonada e um volume apropriado foi inoculado em meios de cultura específicos, para cada microrganismo quantificado.

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

#### **3.3.2 Quantificação de microrganismos**

##### **Contagem de bolores e leveduras**

A contagem de bolores e leveduras foi efetuada em meio Potato Dextrose Agar (PDA, da Himedia), com adição de 100 mg/L de cloranfenicol (Oxoid), 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.

##### **Contagem total de microrganismos (Mesófilos)**

Placas de Petri com meio de cultura Agar para contagem em placa (*Plate Count Agar* – PCA, da Himedia) foram inoculadas com 1 mL 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.

### **Contagem de Bactérias Lácticas**

A contagem de bactérias lácticas foi realizada através da incorporação de 1mL de cada diluição com o meio de cultura *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS, da Liophilchem) agar, suplementado com cicloheximida (Sigma) a pH 5,7. Após a solidificação do meio inoculado foi adicionado uma segunda camada de meio. A leitura e contagem das colónias foram efetuadas após incubação das placas durante 72 horas a 30 °C.

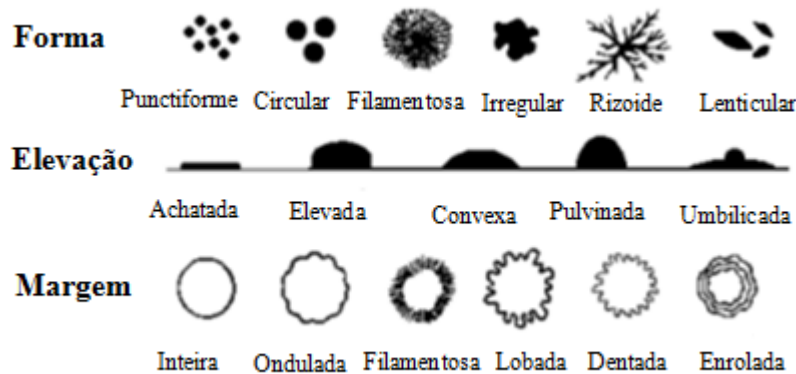
### **3.3.3 Isolamento de leveduras**

As colónias de leveduras morfológicamente semelhantes em meio PDA suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) foram isoladas por repicagens sucessivas separadamente em meio PDA. Os isolados puros obtidos foram em seguida caracterizados morfológicamente e molecularmente de forma a identifica-los até à espécie.

## **3.4 Caracterização morfológica e molecular dos isolados de leveduras**

### **3.4.1 Caracterização morfológica**

As características macroscópicas observadas nas colónias de leveduras foram: diâmetro (em mm), cor, forma, margem, elevação e brilho (Figura 5), de acordo com a metodologia convencional Yarrow, (1998).



**Figura 5** - Características macroscópicas (forma, elevação e margem) de colônias de leveduras em meio sólido. (adaptado de [http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book\\_id=3&fig\\_number=4&chap\\_number=7](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=3&fig_number=4&chap_number=7)).

### 3.4.2 Caracterização molecular

#### 3.4.2.1 Extração de DNA genômico de leveduras

Uma ansa de células, removidas de uma colônia pura de leveduras, foi introduzida num microtubo de 1,5 mL, contendo 500  $\mu$ L de tampão de lise SDS (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,5% SDS) e 0,5 g de esferas de vidro estéreis (0,4-0,6 mm diâmetro, Sartorius). Após a ressuspensão das células, procedeu-se à mistura da solução em vórtex durante 5 min.. Adicionou-se de seguida, 250  $\mu$ L de 3M acetato de sódio pH 5,5 (-20°C) e homogeneizou-se a solução por inversão. Após incubação a -20°C durante 19 min., recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo por centrifugação a 10.500 rpm (4°C), durante 10 min.. O sobrenadante foi precipitado com igual volume de isopropanol (-20°C) por inversão suave e incubado a -20°C durante uma noite. O DNA foi recolhido por centrifugação a 10.500 rpm (4°C), durante 10 min., lavado com 500  $\mu$ L etanol 70% (-20°C) e seco à temperatura ambiente. Após a secagem foi dissolvido em 40  $\mu$ L de água ultrapura a 65°C e armazenado a -20°C.

### **3.4.2.2 Amplificação de DNA**

#### **Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos**

A identificação molecular das leveduras foi efetuada pela amplificação termocíclica da região espaçadora transcrita interna (ITS, *internal transcribed spacer*) do rDNA, utilizando o par de iniciadores nucleotídicos ITS1FO (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4RE (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), respetivamente na orientação direta e inversa (White *et al.*, 1990). A síntese dos iniciadores oligonucleotídicos foi efetuada recorrendo aos serviços da Frilabo (Portugal).

#### **Reações de amplificação termocíclica**

A amplificação termocíclica da região ITS foi efetuada no termociclador MyCycler (BioRad). A mistura de reação continha os iniciadores oligonucleotídicos (1 µL de cada à concentração de 10 mM), 5 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 10 µL tampão de PCR 5x (Promega), 1 µL dNTPs 10 mM, 4 µL DNA, 0,2 µL Taq DNA polymerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega) e 27,8 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura para um volume final de 50 µL. O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação das regiões ITS foi 94°C durante 4 min (1 ciclo); 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minutos (35 ciclos); e 72°C durante 10 min (1 ciclo).

#### **Separação electroforética de DNA**

As separações eletroforéticas preparativas e analíticas de fragmentos de DNA foram efetuadas em tinas horizontais (BioRad), através de géis de agarose 0,6% (p/v) em 1x TAE (TAE 10x - 0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 20 mM EDTA) contendo GelRed (Biotium) nas proporções indicadas pelo fabricante. As amostras de DNA, assim como os marcadores de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Promega), foram aplicados nos poços dos géis após adição de 4 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 2 µL de Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega). A separação electroforética foi efetuada em tampão 1x TAE, a uma diferença de potencial de 80 V. O DNA foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador. O registo da

separação electroforética foi analisada no sistema vídeo *Eagle Eye II Still Vídeo System* (*Stratagene*), utilizando o programa *Eagle Sight 3.2* (*Stratagene*).

### **Sequenciação e análise de sequências de DNA**

As reações de sequenciação foram efetuadas recorrendo aos serviços da *Stabvida* (Portugal), utilizando os iniciadores nucleotídicos descritos na amplificação.

As sequências de DNA obtidas (região ITS) foram analisadas utilizando o pacote de programas DNASTAR versão 2.58 (Lasergene). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*), foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank.

### **3.5 Cálculos e tratamento estatístico**

Os resultados são apresentados como a média de três a seis experiências independentes, acompanhados pelo respetivo erro (se) padrão.

As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa SPSS, versão 20, e calculadas pelo teste de Tukey, para probabilidades  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  considerando-se, respetivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

A relação entre a região ITS do rDNA das diversas espécies de leveduras identificadas foi avaliada pelo alinhamento das sequências obtidas seguida pela construção de uma árvore filogenética, no programa MegAlign (Lasergene-DNASTAR), pelo método de Clustal utilizando a tabela dos pesos residuais PAM250.

A diversidade de espécies de leveduras na salmoura e na polpa de azeitona, para cada tempo de amostragem, foi calculada pelos índices de diversidade de Shannon-Wiener (H), Simpson (D), Chao & Lee 1 e Jackknife 1, recorrendo ao programa *Species Diversity and Richness*, Versão 4 (Seaby e Henderson, 2007). A similaridade entre a salmoura e a polpa da azeitona, em termos de população de leveduras, foi avaliada pela determinação dos índices de similaridade de Jaccards, Sorensen e Bray-Curtis, utilizando o programa *Community Analysis Package* - versão 4 (Seaby e Henderson, 2007)

A medição da correlação entre os parâmetros químicos (acidez titulável e pH) avaliados na salmoura e a riqueza (nº de espécies) e a abundância de leveduras foi efetuada mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman, recorrendo ao programa estatístico SPSS, versão 20.

# CAPÍTULO 4

---

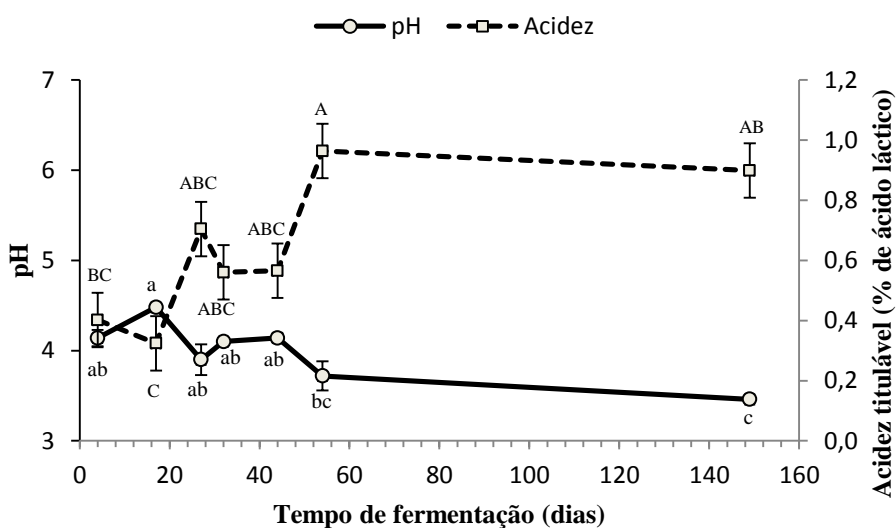


## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Evolução do pH e acidez titulável durante a fermentação

Os parâmetros químicos, pH e acidez titulável, foram usados para monitorizar o processo de fermentação. Na Figura 6 encontram-se esquematizados os valores de acidez titulável e pH obtidos na salmoura durante a fermentação das azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo.

Em relação à acidez, observou-se no início da fermentação (primeiros 17 dias) um decréscimo dos valores, de 0,40 para 0,32g de ácido láctico/100 mL de salmoura (Figura 6). Seguidamente, o valor de acidez aumentou atingindo o valor mais alto aos 54 dias de fermentação, valor este significativamente mais elevado (0,96 g de ácido láctico/100 mL de salmoura) do observado no início da fermentação. Após esta fase, a acidez manteve-se constante até ao final do processo de fermentação (0,90 g de ácido láctico/100 mL de salmoura).



**Figura 6** - Evolução da acidez titulável e do pH (média  $\pm$  erro padrão; n=3) durante a fermentação.

As médias seguidas por letras diferentes, minúsculas para o valor de pH e maiúsculas para os valores de acidez titulável, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.

Ao contrário do observado em relação à acidez, os valores de pH aumentaram nos primeiros dias de fermentação (Figura 6) atingindo o valor de 4,48 aos 17 dias. A partir deste período observou-se um decréscimo dos valores de pH, atingindo um valor

mínimo de 3,46 no final da fermentação, valor este significativamente mais baixo do observado na fase inicial.

O valor de pH observado no final da fermentação é concordante com o intervalo de valores (4,0 e 4,5) referidos por diversos autores (Fernández *et al.*, 1997) para azeitonas de mesa. De acordo com Tofalo *et al.* (2012b), valores de pH inferiores a 4,5 são desejáveis no final da fermentação visto protegerem as azeitonas contra processos de deterioração e inibirem o crescimento de microrganismos patogénicos durante o armazenamento, como o *Clostridium botulinum*.

O aumento da acidez titulável e o conseqüente decréscimo dos valores de pH, observado ao longo dos primeiros 54 dias de fermentação, poderá estar relacionado com a produção de ácidos orgânicos (Hutkins, 2006), como o ácido acético, o ácido málico e o ácido láctico, pelos microrganismos a partir dos açúcares (como a glicose, a frutose e a sacarose) presentes nas azeitonas (Tofalo *et al.*, 2012b). A presença destes ácidos é comum em fermentações de azeitonas verdes e pretas (Sánchez *et al.*, 2000; Spyropoulou *et al.*, 2001; Nychas *et al.*, 2002; Tassou *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2003; Chorianopoulos *et al.*, 2005).

## **4.2 Variação da população microbiana na salmoura e polpa de azeitona durante a fermentação**

No Quadro 2 encontram-se os resultados da flora microbiana indígena presente na polpa da azeitona da cv. Negrinha de Freixo antes de ser submetida ao processo fermentativo. Os resultados indicam a presença de todos os microrganismos pesquisados. As leveduras foram a população predominante, apresentando contagens de 3,59 log UFC/g, seguindo-se os microrganismos mesófilos aeróbios com contagens de 3,13 log UFC/g. A população de bolores foi a que ocorreu em menor número no fruto (1,06 log UFC/g).

**Quadro 2** – Abundância (média  $\pm$  desvio padrão) dos diferentes grupos de microrganismos na polpa de azeitona cv. Negrinha de Freixo, imediatamente antes de ser submetida ao processo fermentativo.

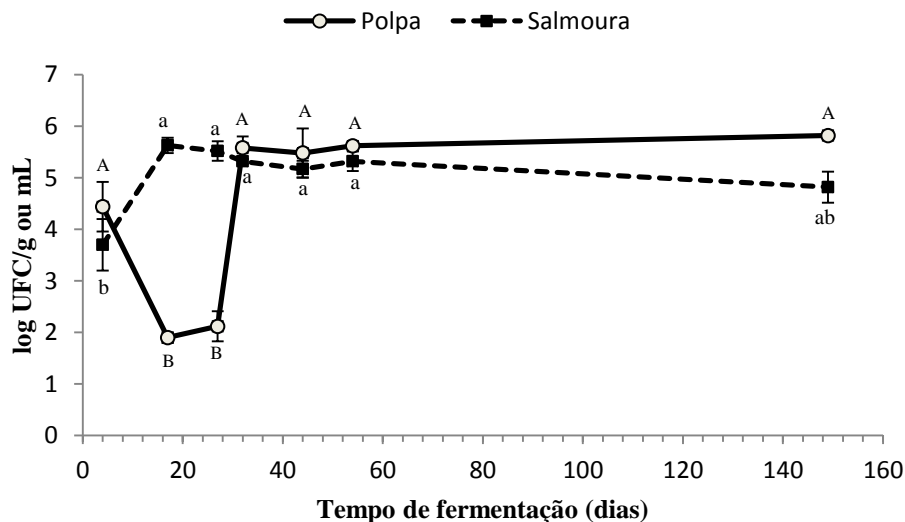
<b>Microrganismos</b>	<b>Abundância (log UFC/g)</b>
Mesófilos	3,13 $\pm$ 0,13
Bactérias lácticas	2,60 $\pm$ 0,49
Bolores	1,06 $\pm$ 0,10
Leveduras	3,59 $\pm$ 0,51

Após a imersão das azeitonas em salmoura, com uma concentração de NaCl na ordem dos 4,5 a 6 %, a população microbiana indígena da polpa da azeitona e da salmoura sofreu flutuações no decorrer do processo de fermentação natural, tal como se pode observar nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Estas flutuações na população microbiana provavelmente são o resultado de variações das condições ambientais da solução de imersão (salmoura) ao longo do processo fermentativo.

Assim, no que respeita à população de **mesófilos** (Figura 7) na polpa de azeitona, verificou-se nos primeiros 17 dias de fermentação uma redução significativa, seguindo-se uma fase de crescimento exponencial até ao dia 32, entrando a população a partir daqui em fase estacionária. As contagens obtidas durante a fermentação situaram-se entre 1,90 e 5,82 log UFC/g.

A população de mesófilos na salmoura apresentou um comportamento oposto na fase inicial do processo de fermentação caracterizado por um aumento significativo nos primeiros 17 dias, seguida de um período de crescimento estacionário até ao final. As contagens obtidas durante a fermentação situaram-se entre 3,70 e 5,63 log UFC/mL.

A presença deste grupo de microrganismos na salmoura e na polpa de azeitona de cultivares portuguesas foi também observado por Alves *et al.* (2012) durante a fermentação e por Nogueira *et al.* (2012a) em azeitonas de mesa obtidas na fase final de fermentação de produtores artesanais da região do Nordeste de Portugal. Similarmente, em diversas amostras comerciais de azeitona de mesa de cultivares italianas foi identificada também a presença destes microrganismos, em quantidades a variar entre 4,9 e 5,9 log UFC/g na polpa e entre 6,2 e 7,9 log UFC/mL na salmoura (Tofalo *et al.*, 2012b).



**Figura 7** - Evolução da população de mesófilos, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para mesófilos na polpa da azeitona e minúsculas para mesófilos na salmoura, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.

Comparando as duas matrizes analisadas no presente trabalho, verificou-se que a população de microrganismos mesófilos é significativamente superior na salmoura face à polpa de azeitona ( $p < 0,01$ ) no período compreendido entre os 17 e os 27 dias de fermentação (Figura 7). Pelo contrário, no final da fermentação a população de mesófilos foi significativamente mais elevada na polpa ( $p < 0,01$ ) relativamente à salmoura, ao contrário do observado em várias amostras de azeitonas de mesa de cultivares portuguesas (Pereira *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2012a) e italianas (Tofalo *et al.*, 2012b).

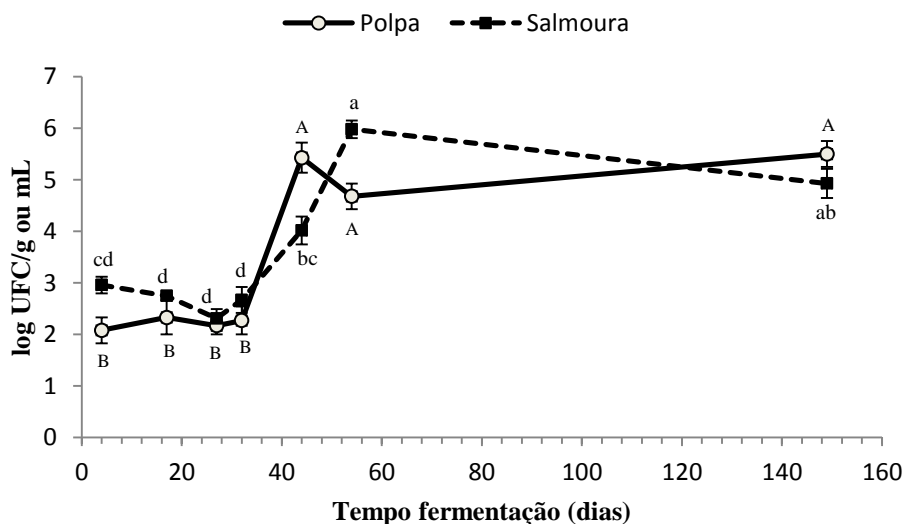
A redução significativa da população de mesófilos na polpa de azeitona observada na fase inicial do processo fermentativo poderá estar relacionada com a maior quantidade de compostos fenólicos presentes na polpa do fruto, face à salmoura. De facto, alguns dos compostos fenólicos presentes nas azeitonas, particularmente o composto oleuropeína (Furneri *et al.*, 2002) tem revelado propriedades antimicrobianas (Mendes *et al.*, 2012) podendo, conseqüentemente inibir o desenvolvimento destes microrganismos.

No que respeita à população de **bactérias lácticas** na polpa e salmoura (Figura 8), esta manteve-se em quantidades reduzidas na fase inicial do processo fermentativo. Contudo, aos 44 dias observou-se um acréscimo significativo da sua população

estabilizando em seguida até ao final da fermentação. Os valores obtidos na polpa de azeitona variaram entre 2,08 e 5,50 log UFC/g e na salmoura situaram-se entre 2,31 e 5,98 log UFC/g ao longo do processo fermentativo. Não se registaram diferenças significativas nas contagens de bactérias lácticas entre a salmoura e a polpa da azeitona durante todo o processo fermentativo ( $p > 0,05$ ).

Estudos realizados por Hurtado *et al.* (2008) em fermentações espontâneas da cultivar Arbequina indicaram a presença deste grupo de microrganismos na salmoura somente a partir dos 15 dias de fermentação, observando-se um crescimento exponencial entre os 30 e 60 dias de fermentação, atingindo o valor máximo de 7,5 log UFC/mL. Cocolin *et al.* (2013), em cultivares italianas, verificaram a presença de bactérias lácticas logo nos primeiros 3 dias de fermentação espontânea, quer na superfície do fruto (2,54 log UFC/g) quer na salmoura (4,23 log UFC/mL), seguida por um aumento exponencial até aos 10 - 15 dias, atingindo um valor máximo 7,06 log UFC/g na superfície do fruto e de 6,06 log UFC/mL na salmoura. Contudo Alves *et al.* (2012) não detetaram a presença destas bactérias durante a fermentação de azeitonas britadas da cultivar portuguesa, Manzanilha.

O reduzido crescimento das bactérias lácticas observado nos primeiros dias de fermentação poderá ter resultado da presença de compostos fenólicos presentes na polpa da azeitona (Arroyo-López *et al.*, 2008b) e difundidos para a salmoura, como também da presença de sais e menor disponibilidade de nutrientes no meio (Aponte *et al.*, 2010). De acordo com Ruiz-Barba *et al.* (1990), os compostos fenólicos no meio exercem um efeito bactericida nestes microrganismos, através da alteração da parede celular e da membrana citoplasmática. O composto oleuropeína e seus produtos de hidrólise (agliconas, ácido elenoico e hidroxitirosol) têm sido apontados como os principais responsáveis por este efeito (Ruiz-Barba *et al.*, 1993). À semelhança do observado por Hurtado *et al.* (2008) em azeitonas da cv. Arbequina, durante a predominância das bactérias lácticas nas etapas finais da fermentação o pH da salmoura foi estável (Figura 6).



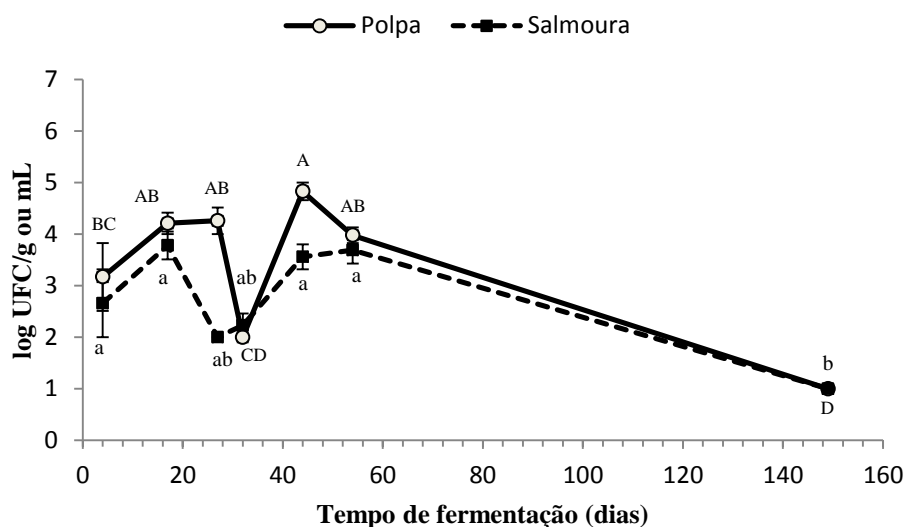
**Figura 8** - Evolução da população de bactérias lácticas, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para bactérias lácticas na polpa da azeitona e minúsculas para bactérias lácticas na salmoura, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.

A população de **bolores** (fungos filamentosos) na polpa atingiu o valor máximo de crescimento aos 44 dias (4,83 log UFC/g) e o valor mínimo no final do período de fermentação (1 log UFC/g) (Figura 9). Na salmoura, o valor máximo foi atingido aos 17 dias (3,78 log UFC/mL), tendo-se observado em seguida um decréscimo significativo desta população no final do período de fermentação. As contagens de bolores nas duas matrizes analisadas, salmoura e polpa, foram muito similares, excetuando os dias 27 e 44 em que se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

À semelhança do observado no presente trabalho, foi detetada a presença de bolores ao longo do processo de fermentação de azeitonas da cultivar Manzanilha, com contagens finais na salmoura de 1 log UFC/mL (Alves, 2010). Similarmente, em azeitonas de mesa de cultivares italianas durante a fermentação natural espontânea, foi identificada a presença de bolores quer na superfície do fruto quer na salmoura, com valores finais na ordem dos 5,16 log UFC/g e 5,35 log UFC/mL, respetivamente (Cocolin *et al.*, 2013).

A presença destes microrganismos à superfície dos recipientes de fermentação é habitual quando não são asseguradas condições de anaerobiose durante a fermentação (Alves, 2010). A presença de bolores é indesejável quando ocorre em número elevado,

devido à produção de micotoxinas e de compostos fétidos por parte de algumas espécies, bem como pela alteração da textura dos vegetais (Hutkins, 2006).



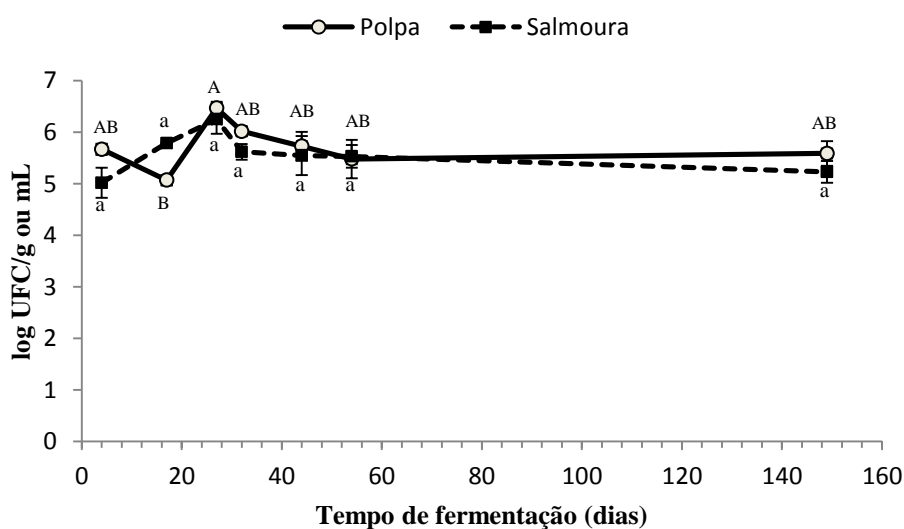
**Figura 9** - Evolução da população de bolores, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para bolores na polpa da azeitona e minúsculas para bolores na salmoura, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.

No que concerne à população de **leveduras**, observou-se a sua predominância durante todo o período de fermentação quando comparado com os outros microrganismos pesquisados (Figura 10). Os valores obtidos nas duas matrizes analisadas foram muito semelhantes ao longo da fermentação, com exceção do dia 17 em que foram significativamente mais elevados na salmoura ( $p < 0,01$ ), face à polpa. As contagens obtidas na polpa variaram desde 5,07 e 6,47 log UFC/g, ao passo que na salmoura foram de 5,01 a 6,25 log UFC/mL.

A evolução do crescimento da população de leveduras ao longo do processo fermentativo natural de azeitonas de cultivares italianas (Aponte *et al.*, 2010; Cocolin *et al.*, 2013) e espanholas (Hurtado *et al.*, 2008; Bautista-Gallego *et al.*, 2011) mostrou um padrão muito similar ao do presente estudo atingindo um valor máximo ( $\approx 6 - 7$  log UFC/mL) ao fim de 20-40 dias, altura a partir da qual a população decresceu ligeiramente ou se manteve sensivelmente constante até ao fim da fermentação. Cocolin *et al.* (2013) observaram o mesmo padrão de evolução das leveduras na superfície de azeitonas ao longo do processo fermentativo.

Os valores das contagens de leveduras observados no presente estudo encontram-se abaixo do limite máximo estabelecido pelo Codex Alimentarius (2010), 9 log UFC/mL ou grama, e situam-se entre os referidos em outros estudos realizados em fermentações de azeitona como por exemplo, 4 e 6 log UFC/ml (Marquina *et al.*,1992; Nisiotou *et al.*, 2009) e 5 log UFC/mL em azeitonas da cv. Arbequina (Hurtado *et al.*, 2008). Estudos efetuados com azeitonas de mesa de cultivares portuguesas obtidas no mercado tradicional (Pereira *et al.*, 2008) e na fase final do processo de fermentação de produtores regionais (Nogueira *et al.*, 2012a) também indicam populações de leveduras máximas de 6 log UFC/mL (Nogueira *et al.*, 2012a) e 6,5 UFC/mL (Pereira *et al.*, 2008) na salmoura e 5,78 log UFC/g (Nogueira *et al.*, 2012a) e 6,3 UFC/g (Pereira *et al.*, 2008) na polpa.

Valores de leveduras superiores a 7 log UFC/mL ou grama durante a fermentação são indesejáveis devido à produção excessiva de CO<sub>2</sub>, durante a sua atividade metabólica, que pode penetrar nas azeitonas, danificando-as (Fernández Díez *et al.*, 1985, citado por Arroyo-López *et al.*, 2008b). Podem ainda, produzir outros gases responsáveis pela produção de odores e sabores desagradáveis (Arroyo-López *et al.*, 2008a). Em resultado disto, poderá ocorrer amolecimento da polpa, abaulamento das embalagens onde são empacotados e turvação da salmoura (Tofalo *et al.*, 2012b).



**Figura 10** - Evolução da população de leveduras, na salmoura e polpa de azeitona, durante a fermentação de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. As médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas para leveduras na polpa da azeitona e minúsculas para leveduras na salmoura, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, nos diferentes tempos de fermentação.

A dominância desta população durante a fermentação, relativamente aos outros microrganismos pesquisados, está relacionada com o facto de as leveduras serem mais tolerantes às condições ambientais habitualmente encontradas no processamento de azeitona de mesa, como, por exemplo, concentrações de sais, entre 8-10% (Fernández *et al.*, 1997; Panagou *et al.*, 2008; Rejano *et al.*, 2010), pH baixo, valores extremos de temperatura (Fernández *et al.*, 1997), e aos compostos fenólicos presentes (Arroyo-López *et al.*, 2009).

### **4.3 Caracterização dos isolados de leveduras**

#### **4.3.1 Morfológica**

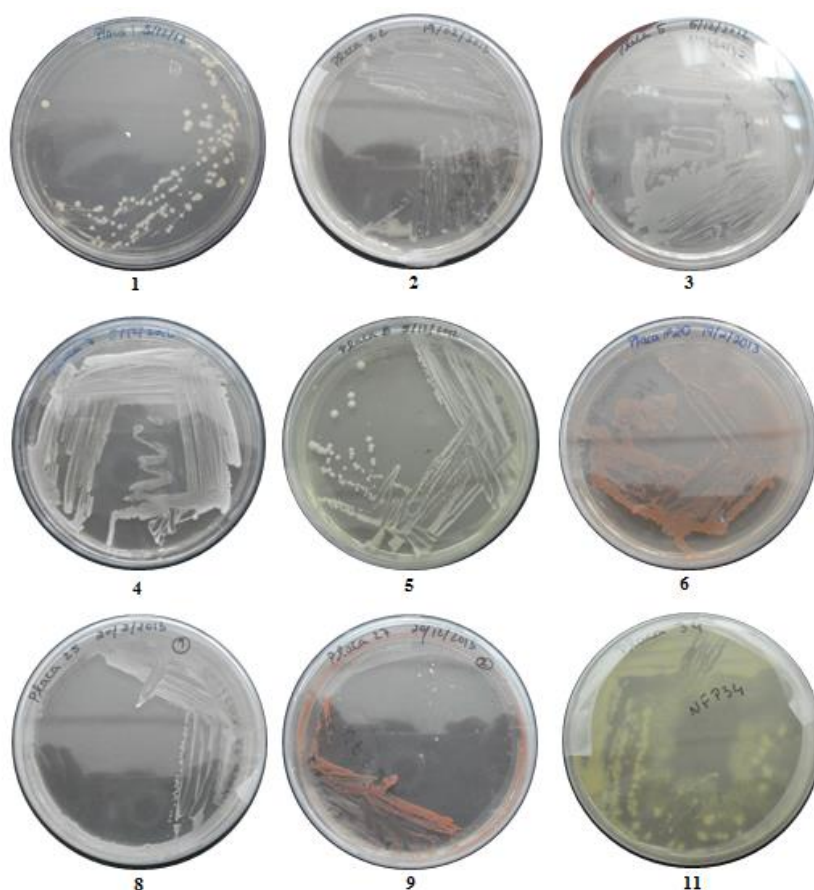
Após a quantificação das leveduras nas matrizes analisadas, procedeu-se à caracterização morfológica das colónias presentes nas placas com meio PDA com adição de cloranfenicol, onde se avaliaram alguns aspetos morfológicos tais como, diâmetro, forma, margem, elevação, cor e transparência.

Atendendo aos resultados expressos no Quadro 3, verificou-se que as colónias apresentavam características morfológicas muito semelhantes, mas com grande variedade de diâmetros entre 2 e 15 mm. A maioria das colónias eram brancas, circulares, com margem inteira, opacas e com elevação achatada (Quadro 3, Figura 11). De entre as colónias obtidas destacam-se as colónias nº 6 e nº 9 por apresentarem uma cor salmão e elevação convexa (Figura 11).

Posteriormente, as colónias foram agrupadas de acordo com as características morfológicas obtendo-se um total de 11 grupos diferentes.

**Quadro 3** - Características morfológicas das leveduras isoladas na salmoura e na polpa de azeitona durante o processo fermentativo.

<b>Leveduras</b>		<b>Características morfológicas</b>				
<b>Código</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Forma</b>	<b>Margem</b>	<b>Elevação</b>	<b>Cor</b>	<b>Transparência</b>
<b>1</b>	7	Circular	Inteira	Elevada	Branca	Opaca
<b>2</b>	10	Irregular	Convexa	Achatada	Branca	Opaca
<b>3</b>	3	Circular	Inteira	Elevada	Branca	Opaca
<b>4</b>	4	Circular	Inteira	Umbilicada	Creme	Translúcida
<b>5</b>	2	Circular	Inteira	Elevada	Branca	Opaca
<b>6</b>	7	Circular	Inteira	Convexa	Salmão	Opaca
<b>7</b>	2	Oval	Inteira	Achatada	Branca	Opaca
<b>8</b>	5	Circular	Inteira	Achatada	Bege	Opaca
<b>9</b>	15	Irregular	Ondulada	Achatada	Salmão	Translúcida
<b>10</b>	15	Oval	Ondulada	Convexa	Branca/creme	Opaca
<b>11</b>	10	Circular	Inteira	Achatada	Branca	Opaca



**Figura 11** - Aspeto macroscópico das colónias de leveduras isoladas.

#### 4.3.2 Molecular

Após a caracterização morfológica das colónias e posterior obtenção de culturas puras, procedeu-se à identificação molecular dos isolados.

Os isolados foram identificados por amplificação termocíclica da região ITS do rDNA nuclear, seguida de sequenciação.

No Quadro 4 apresentam-se as espécies obtidas após consulta no servidor NCBI, bem como o N° de acesso de cada espécie, que identifica o registo da sequência depositada no GenBank.

Após realização do Blastn, onde se comparou as sequências de nucleotídios obtidas com as do banco de dados GenBank, obtiveram-se nas duas matrizes analisadas um total de 11 espécies de leveduras (Quadro 4). O filo mais representado foi o Ascomycota, com 9 espécies, pertencentes aos géneros *Candida* (3 espécies), *Pichia* (3

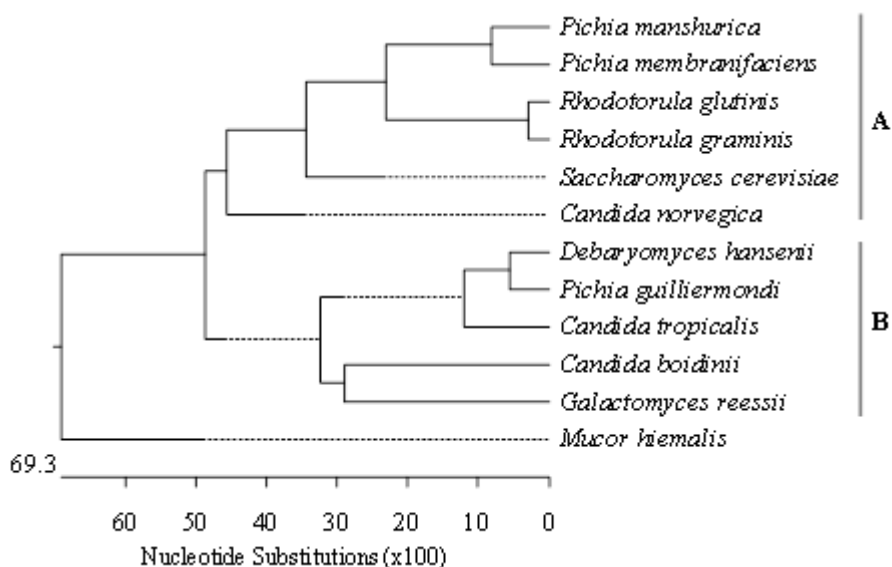
espécies), *Debaryomyces*, *Saccharomyces* e *Galactomyces*, cada uma com uma espécie. As restantes espécies pertencem ao filo Basidiomycota e ao género *Rhodotorula*.

**Quadro 4** – Espécies identificadas após comparação das sequências obtidas com as do banco de dados do GenBank, por meio do Blastn com a espécie de maior identidade (%).

Espécie	Código	Nº de acesso	Máxima Identidade (%)	E-value
<i>Candida boidinii</i>	7	FJ914929	99	0,0
<i>Candida norvegica</i>	4	KC542800	99	0,0
<i>Candida tropicalis</i>	1	JQ904699	98	0,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5	HF545662	99	0,0
<i>Galactomyces reessii</i>	11	HQ436459	100	2e <sup>-113</sup>
<i>Pichia guilliermondii</i>	8	KC544479	99	0,0
<i>Pichia manshurica</i>	10	JX847776	99	0,0
<i>Pichia membranifaciens</i>	2	DQ104722	99	0,0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	9	HF934032	98	0,0
<i>Rhodotorula graminis</i>	6	FR717631	99	0,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	HF545670	100	0,0

A árvore filogenética, construída com base no alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes aos fragmentos das várias espécies de leveduras identificadas encontra-se representada na Figura 12. Nesta análise utilizou-se a espécie *Mucor hiemalis* (Nº de acesso KC009126) como grupo externo (*outgroup*) por ser próximo ao grupo estudado, mas contudo distinto por pertencer ao filo Zigomicota. Na árvore obtida é possível identificar dois grupos distintos (A e B). O primeiro grupo (A) integra as espécies *P. manshurica* e *P. membranifaciens*, ambas da família Pichiaceae, que formam um sub-grupo; e as espécies *R. glutinis* e *R. graminis*, cuja família ainda se encontra por determinar (*incertae sedis*), que formam um segundo sub-grupo. Inclui ainda as espécies *S. cerevisiae* (família Saccharomycetaceae) e *C. norvegica* (*incertae sedis*). Por sua vez, no grupo B, encontram-se duas espécies do género *Candida* (*C. boidinii* e *C. tropicalis*), uma *Pichia* (*P. guilliermondii*) e as espécies *D. hansenii* (*incertae sedis*) e *G. reessii* (família Dipodascaceae). Estes resultados mostram que, de

uma maneira geral, as espécies de leveduras que integram a mesma família ou género não possuem uma relação filogenética. Este aspeto foi particularmente notório para as espécies do género *Candida*. Até à data ainda não foi possível identificar a posição taxonómica exata deste táxon sendo, por isso, classificado por *incertae sedis*. A reduzida filogenia entre as três espécies de *Candida* identificadas no presente trabalho confirma a dificuldade da classificação taxonómica deste táxon. De entre as diferentes espécies identificadas, as que apresentaram um elevado grau de semelhança são *R. glutinis* e a *R. graminis*, bem como a *P. manshurica* e a *P. membranifaciens*.



**Figura 12** - Árvore filogenética representando a relação entre a região ITS do rDNA das diversas espécies de leveduras identificadas. As sequências nucleotídicas foram alinhadas através do programa MegAlign (DNASTAR), pelo método de Clustal utilizando a tabela dos pesos residuais PAM250. O comprimento de cada par de ramos representa a distância entre cada par de sequências. A escala que se encontra sob a árvore mede a distância entre as sequências. A espécie *Mucor hiemalis* (Nº de acesso KC009126) foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) que é próximo ao grupo estudado, mas ainda assim claramente distinto dele.

#### 4.4 Evolução das espécies de leveduras durante a fermentação

A evolução e abundância das espécies de leveduras identificadas na salmoura e polpa ao longo do processo fermentativo encontram-se nos Quadros 5 e 6, respetivamente. Devido ao excesso de trabalho, não foi possível proceder à quantificação e à identificação molecular de leveduras no dia 27 na salmoura e no dia 17 na polpa de azeitona.

Durante a fermentação identificaram-se um total de 1130 isolados na salmoura e 1492 isolados na polpa, pertencentes ao género *Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*.

As espécies de leveduras identificadas na salmoura foram *Candida boidinii*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces reessii*, *P. membranifaciens*, *Pichia manshurica* e *Saccharomyces cerevisiae* (Quadro 5). Na polpa foram igualmente identificadas estas espécies, à exceção de *P. manshurica*, e ainda as espécies *C. norvegica*, *P. guilliermondii*, *Rhodotorula graminis* e *R. glutinis* (Quadro 6).

As espécies mais abundantes na salmoura (Quadro 5) e polpa de azeitona (Quadro 6) durante todo o período de fermentação foram *S. cerevisiae* (48,32% e 54,29%, respetivamente), *C. tropicalis* (27,17% e 16,82%, respetivamente), *P. membranifaciens* (12,21% e 13,27%, respetivamente) e *C. boidinii* (6,99% e 10,46%, respetivamente). As restantes espécies surgiram ocasionalmente em percentagens a variar entre 0,09% (*D. hansenii*) e 4,34% (*G. reessii*) na salmoura, e 0,13% (*C. norvegica*) a 2,55% (*P. guilliermondii*) na polpa.

A abundância relativa de cada uma das espécies de leveduras identificadas na salmoura e na polpa de azeitona durante a fermentação encontra-se na Figura 13. No início da fermentação, primeiros 4 dias, as espécies que apresentaram uma abundância relativa elevada na salmoura foram *C. boidinii* (62,75%), *P. manshurica* (19,61%) e *C. tropicalis* (15,69%) (Figura 13A), ao passo que na polpa, este período foi dominado pela *P. membranifaciens* (55,91%) e pela *S. cerevisiae* (32,28%) (Figura 13B). A partir dos dias 17 até ao final da fermentação, as espécies principalmente envolvidas no processo fermentativo foram *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* (Figuras 13A e 13B).

Vários autores (Arroyo-López *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010; Bautista-Gallego *et al.*, 2011) identificaram também a levedura *S. cerevisiae* no processamento de diferentes cultivares de azeitonas de mesa. Esta espécie tem um papel

importante na conservação das azeitonas de mesa, uma vez que protege o produto da oxidação dos ácidos gordos insaturados (Hernández *et al.*, 2007).

**Quadro 5** - Evolução e abundância de leveduras na salmoura ao longo do processo fermentativo.

Espécies de leveduras	Dias								Total	Abundância (%)
	0	4	17	27	32	44	54	149		
<i>Candida tropicalis</i>		8	58	NI	34	16	130	61	307	27,17
<i>Pichia membranifaciens</i>				NI		8	112	18	138	12,21
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		1	50	NI	14	34	301	146	546	48,32
<i>Debaryomyces hansenii</i>				NI			1		1	0,09
<i>Candida boidinii</i>		32		NI		11	32	4	79	6,99
<i>Pichia manshurica</i>		10		NI					10	0,88
<i>Galactomyces reessii</i>				NI	35	13	1		49	4,34
<b>Total</b>		<b>51</b>	<b>108</b>		<b>83</b>	<b>82</b>	<b>577</b>	<b>229</b>	<b>1130</b>	<b>100</b>

NI – Não identificado.

**Quadro 6** - Evolução e abundância de leveduras na polpa ao longo do processo fermentativo.

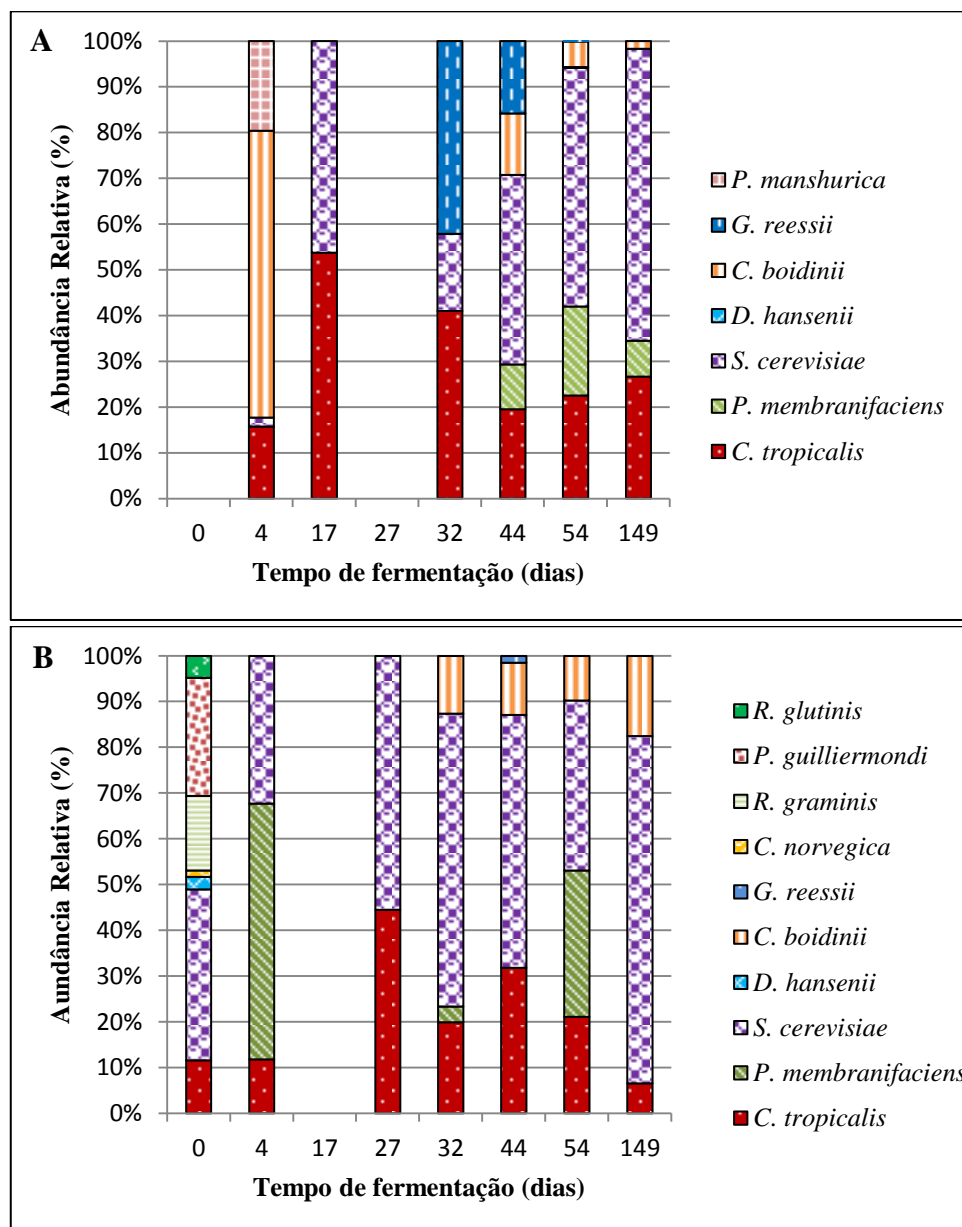
Espécies de leveduras	Dias								Total	Abundância (%)
	0	4	17	27	32	44	54	149		
<i>Candida tropicalis</i>	17	15	NI	20	52	42	78	27	251	<b>16,82</b>
<i>Pichia membranifaciens</i>		71	NI		9		118		198	<b>13,27</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55	41	NI	25	167	73	137	312	810	<b>54,29</b>
<i>Candida norvegica</i>	2		NI						2	<b>0,13</b>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4		NI						4	<b>0,27</b>
<i>Rhodotorula graminis</i>	24		NI						24	<b>1,61</b>
<i>Candida boidinii</i>			NI		33	15	36	72	156	<b>10,46</b>
<i>Pichia guilliermondii</i>	38		NI						38	<b>2,55</b>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	7		NI						7	<b>0,47</b>
<i>Galactomyces reessii</i>			NI			2			2	<b>0,13</b>
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>127</b>		<b>45</b>	<b>261</b>	<b>132</b>	<b>369</b>	<b>411</b>	<b>1492</b>	<b>100</b>

NI – Não identificado.

*Candida tropicalis* foi referida por Bautista-Gallego *et al.* (2011) e Arroyo-López *et al.* (2008b), como predominante nas fases iniciais do processo de fermentação. Neste trabalho, além de ter sido detetada na fase inicial do processo de fermentação foi também identificada na salmoura e polpa em todos os estágios do processo fermentativo (Figura 13). A presença desta espécie em salmouras de azeitonas foi também mencionada por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) e Villa-Carvajal *et al.* (2006) em azeitonas espanholas das cultivares Gordal no início da fermentação e Manzanilha no início e meio da fermentação. Esta espécie é capaz de degradar os polifenóis (Arroyo-López *et al.*, 2008b), e produzir ácido cítrico (Abbas *et al.*, 2006), diminuindo o pH do meio e consequente aumento da acidez.

*Pichia membranifaciens* foi identificada em diversas preparações de azeitonas pretas e verdes (Coton *et al.*, 2006; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010) na fase inicial do processo de fermentação da variedade Hojiblanca (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010) e final de azeitonas pretas (Coton *et al.*, 2006). Também outros autores referem a predominância desta espécie durante a fermentação espontânea de azeitonas portuguesas (Marquina *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2007; Hurtado *et al.*, 2008) e de azeitonas espanholas da cultivar Arbequina (Marquina *et al.*, 1992; Hurtado *et al.*, 2008). Neste trabalho, esta espécie, foi identificada na salmoura nas etapas finais e na polpa no início e meio da fermentação. Esta espécie tem a capacidade de assimilar ácido láctico reduzindo a acidez do meio. Apresenta características metabólicas desejáveis, contribui para síntese de todas as vitaminas do complexo B, essenciais para o crescimento de bactérias lácticas (Silva *et al.*, 2011). Também contribui para a preservação das azeitonas contra a oxidação dos ácidos gordos insaturados e formação de peróxidos (Hernández *et al.*, 2007).

No presente trabalho a espécie *P. manshurica* (também designada por *P. galeiformis*) foi detetada exclusivamente na salmoura nos primeiros 4 dias de fermentação, ao contrário do observado por Bautista-Gallego *et al.* (2011) e Nogueira *et al.* (2012b) que referem a presença desta espécie no final do processo fermentativo de azeitonas das cultivares Manzanilla e Cobrançosa, respetivamente. Rodríguez-Gómez *et al.* (2010) relataram também a presença deste microrganismo durante o armazenamento de azeitonas das cultivares Manzanilla e Hojiblanca.



**Figura 13** - Abundância relativa das espécies de leveduras identificadas na salmoura (A) e na polpa de azeitona (B) durante a fermentação.

*Candida boidinii* foi descrita por diversos autores (Coton *et al.*, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008b; Hurtado *et al.*, 2008 e 2009; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010, Nogueira *et al.*, 2012b) em azeitonas de mesa obtidas por fermentação natural na fase final do processo fermentativo. Neste trabalho esta levedura surgiu na salmoura com uma abundância relativa elevada no início da fermentação (62,75%) reduzindo a sua abundância nas etapas finais (Quadro 5, Figura 13A). A sua presença na polpa foi detetada apenas a partir dos 32 dias de fermentação, tendo-se mantido a sua abundância

constante até ao final do processo (Quadro 6, Figura 13B). Esta levedura apresenta atividade lipolítica (Bautista-Gallego *et al.*, 2011), contribuindo de forma favorável para o sabor do produto, uma vez que permite a formação de compostos voláteis (Hernández *et al.*, 2007; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010).

A espécie *P. guilliermondi* encontra-se associada à produção de compostos voláteis em fermentações (Sangorrin *et al.*, 2007), mas raramente tem sido associada à produção de azeitona de mesa (Arroyo-López *et al.*, 2007). Contudo, Aponte *et al.* (2010) revelam a presença desta espécie durante todo o período de fermentação de azeitonas verdes sicilianas e Rodrigues (2011) na fase final de fermentação de azeitonas da variedade Manzanilha. Neste trabalho, esta espécie foi identificada apenas no fruto antes do início da fermentação (Quadro 6 e Figura 13B).

*Candida norvegica* (anteriormente designada *Torulopsis norvegica*) tem sido associada à ocorrência de fenómenos indesejáveis em fermentações espontâneas de azeitonas pretas (Quintana *et al.*, 1979). Neste trabalho esta espécie surgiu apenas no fruto antes do início da fermentação com uma percentagem relativa baixa (1,36%) (Figura 13B).

Segundo Nisiotou *et al.* (2009) e Kotzekidou (1997), *D. hansenii* foi a espécie dominante no início da fermentação espontânea em azeitonas de mesa pretas produzidas seguindo o método grego. Hernández *et al.* (2007) referem a presença desta levedura durante o processamento de azeitonas verdes portuguesas. No entanto, neste trabalho foi apenas identificada na polpa antes da fermentação e durante a fase final em percentagens relativas insignificantes (2,72% e 0,17%, respetivamente). Esta levedura apresenta atividade lipolítica (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2010).

Em relação às leveduras do género *Rhodotorula*, identificou-se neste trabalho a presença de duas espécies, *R. graminis* e *R. glutinis*, apenas na polpa e antes do início da fermentação. Estas leveduras apresentam um pigmento cor de salmão. Até ao momento, *R. graminis* não tem sido associada ao processamento de azeitonas de mesa, enquanto que *R. glutinis* foi referida por Arroyo-López *et al.* (2008b), Hurtado *et al.* (2008), Aponte *et al.* (2010), Bautista-Gallego *et al.* (2011), Alves *et al.* (2012), no início do processo de fermentação. A presença desta espécie, na elaboração de azeitonas de mesa, pode estar relacionada com o amolecimento das azeitonas, e com a formação de uma película na salmoura (Hernández *et al.*, 2008), podendo, no entanto, ter um papel benéfico na difusão de nutrientes (Hurtado *et al.*, 2008).

*Galactomyces reessii* foi identificada no meio do processo fermentativo, surgindo com uma abundância relativa baixa na polpa (1,52%) e a variar entre 0,17% a 42,16% na salmoura (Figura 13A e 13B). Até ao momento, o papel desta levedura não tem sido associado ao processamento de azeitonas de mesa.

#### 4.5 Índices de diversidade

Com o objetivo de comparar a diversidade de espécies de leveduras presente na salmoura e na polpa de azeitona, ao longo do processo fermentativo, calcularam-se os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H), Simpson (D), Chao & Lee 1 e Jackknife 1 (Quadro 7 e 8). Estes índices são os mais utilizados para estimar a diversidade de espécies de leveduras em amostras ambientais (Mestre *et al.*, 2011) e alimentares (Setati *et al.*, 2012), incluindo azeitonas de mesa (Cocolin *et al.*, 2013). De entre estes índices, os mais utilizados são o índice de Shannon-Wiener e de Simpson. O primeiro índice atribui um peso igual às espécies raras e abundantes, enquanto que o segundo índice exprime a abundância das espécies mais comuns (Magurran, 2004). O método Jackknife 1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies que ocorrem apenas numa amostra (Magurran, 2004). Por sua vez, o método Chao & Lee 1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras, e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (Magurran, 2004).

Todos os índices calculados estimam uma maior diversidade de espécies de leveduras na salmoura (H = 1,3; D = 2,9; Chao & Lee 1 = 7,0; Jackknife 1 = 7,0) face à polpa de azeitona (H = 1,2; D = 2,6; Chao & Lee 1 = 5,0; Jackknife 1 = 5,0) durante o processo fermentativo (Quadro 7 e 8). Tal como mencionado anteriormente, a reduzida diversidade de leveduras na polpa poderá dever-se à sua composição em compostos fenólicos, que têm revelado possuir atividade antimicrobiana (Mendes *et al.*, 2012).

Verificou-se ainda que a diversidade de leveduras na polpa de azeitona foi superior antes de serem submetidas ao processo fermentativo (tempo 0) face à polpa em condições de fermentação. Antes de ser mergulhada na salmoura, a polpa apresentava um total de 7 espécies de leveduras e com índices de diversidade superiores (H = 1,6; D = 4,1; Chao & Lee 1 = 7,0 e Jackknife 1 = 7,0) quando comparado com a polpa durante o processo fermentativo (Quadro 8). A menor diversidade de espécies registada na polpa durante a fermentação poderá estar relacionada com as condições ambientais

habitualmente encontradas no meio fermentativo (e.g. elevada concentração de sais, pH baixo) que podem favorecer o desenvolvimento de apenas algumas espécies de leveduras. As espécies *C. norvegica*, *R. graminis*, *R. glutinis* e *P. guilliermondii*, por terem surgido exclusivamente na polpa da azeitona antes de serem submetidas à fermentação (Quadro 6), parecem ser sensíveis às condições ambientais encontradas no processo fermentativo.

Os índices de diversidade calculados indicam que a riqueza de espécies de leveduras variou ao longo do processo fermentativo. Nos primeiros 17-27 dias de fermentação observou-se uma diminuição da riqueza de espécies quer na salmoura (Quadro 7) quer na polpa (Quadro 8). A partir desta data a diversidade aumentou nas duas matrizes analisadas atingindo valores máximos aos 44-54 dias de fermentação, decrescendo em seguida até ao final do processo.

**Quadro 7** – Índices de diversidade das espécies de leveduras presentes na salmoura, ao longo do período fermentativo.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Número de espécies</b>	<b>Shannon-Wiener (H)</b>	<b>Simpson (D)</b>	<b>Chao &amp; Lee 1</b>	<b>Jackknife 1</b>
<b>4</b>	4	1,0	2,2	4,1	4,0
<b>17</b>	2	0,7	2,0	2,0	2,0
<b>32</b>	3	1,0	2,7	3,0	3,0
<b>44</b>	5	1,5	3,9	5,0	5,0
<b>54</b>	6	1,2	2,8	7,3	6,0
<b>149</b>	4	0,9	2,1	4,0	4,0
<b>Total</b>	7	1,3	2,9	7,0	7,0

**Quadro 8-** Índices de diversidade das espécies de leveduras presentes na polpa de azeitona, ao longo do período fermentativo

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Número de espécies</b>	<b>Shannon-Wiener (H)</b>	<b>Simpson (D)</b>	<b>Chao &amp; Lee 1</b>	<b>Jackknife 1</b>
<b>4</b>	3	0,9	2,3	3,0	3,0
<b>27</b>	2	0,7	2,0	2,0	2,0
<b>32</b>	4	1,0	2,2	4,0	4,0
<b>44</b>	4	1,0	2,4	4,0	4,0
<b>54</b>	4	1,3	3,4	4,0	4,0
<b>149</b>	3	0,7	1,6	3,0	3,0
<b>Total</b>	5	1,2	2,6	5,0	5,0

#### **4.6 Similaridade da população de leveduras da salmoura e polpa de azeitona**

A semelhança na composição de espécies de leveduras, entre a salmoura e a polpa de azeitona, ao longo do processo fermentativo foi avaliada pelo cálculo de índices de similaridade. Estes índices comparam comunidades de forma qualitativa (presença ou ausência de espécies) ou quantitativa (abundância de espécies). Os índices qualitativos mais utilizados são os índices de Jaccard e de Sorensen. Estes índices avaliam o número de espécies comuns entre duas amostras, neste caso entre a salmoura e a polpa de azeitona, e variam de 0 (nenhuma similaridade) a 1 (total similaridade) (Magurran, 2004). Em geral, valores de índices de Jaccard e de Sorensen superiores a 0,5 indicam elevada similaridade. Um dos índices mais utilizados que considera a abundância das espécies (índice quantitativo) é o de Bray-Curtis. Este índice varia entre 0 (total similaridade) e 1 (nenhuma similaridade) (Magurran, 2004).

A análise da similaridade da população total de leveduras entre a salmoura e a polpa de azeitona, estimada pelos índices de Jaccard, Sorensen e Bray-Curtis, indica a existência de uma grande similaridade (Quadro 9). Nesta análise total, os índices de Jaccard e de Sorensen apresentaram valores superiores ou iguais a 0,5 e o de Bray-Curtis o valor de 0,2. Os resultados indicam ainda uma menor similaridade entre a salmoura e a polpa nos primeiros 32 dias de fermentação, verificando-se depois um aumento da similaridade a partir dos 44 dias de fermentação. Estes resultados sugerem

que as espécies de leveduras envolvidas no processo de fermentação, em ambas as matrizes (polpa e salmoura), é muito similar sobretudo a partir dos 44 dias de fermentação.

**Quadro 9** - Índices de similaridade das espécies de leveduras presentes na salmoura e na polpa de azeitona, ao longo do processo fermentativo.

Índices	Salmoura vs Polpa de azeitona					
	Dia 4	Dia 32	Dia 44	Dia 54	Dia 149	Total
<b>Jaccards</b>	0,4	0,4	0,8	0,7	0,8	0,5
<b>Sorensen</b>	0,6	0,6	0,9	0,8	0,9	0,7
<b>Bray-Curtis</b>	0,9	0,7	0,4	0,3	0,4	0,2

#### 4.7 Correlação entre os parâmetros químicos e a abundância de espécies

A influência dos parâmetros químicos avaliados na salmoura (pH e acidez titulável) na abundância e riqueza de diversas espécies de leveduras, durante o processo fermentativo, foi avaliada mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente mede a intensidade da relação existente entre duas variáveis aleatórias cujo valor pode variar entre -1 a 1 designando-se no primeiro caso, como uma relação inversa e no segundo uma relação direta. Um valor absoluto próximo de zero indica que as variáveis não se correlacionam ou se encontram fracamente correlacionadas.

Os resultados obtidos indicam que o pH e a acidez influenciaram de forma significativa a abundância e a riqueza total de leveduras (Quadro 10). No caso do pH, verificou-se uma correlação inversamente proporcional e forte com o número total de isolados e de espécies (valores de coeficientes de correlação de Spearman de 0,32 e 0,43, respetivamente). No caso da acidez, a correlação foi diretamente proporcional e ligeiramente mais fraca e verificou-se apenas para a riqueza total (valor de coeficiente de correlação de Spearman de 0,25).

**Quadro 10** - Correlação de Spearman entre os parâmetros químicos avaliados na salmoura (pH e acidez titulável) e a abundância de cada espécie, abundância total e riqueza total

<b>Espécies de leveduras</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez titulável</b>
<i>Candida boidinii</i>	-0,25*	n.s.
<i>Candida tropicalis</i>	-0,44***	0,30*
<i>Debaryomyces hansenii</i>	n.s.	n.s.
<i>Galactomyces reessii</i>	n.s.	n.s.
<i>Pichia manshurica</i>	n.s.	n.s.
<i>Pichia membranifaciens</i>	-0,55***	0,44***
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-0,47***	0,35**
<b>Abundância total</b>	-0,32*	n.s.
<b>Riqueza total</b>	-0,43***	0,25*

ns - não significativo; \* significativo ao nível de 0,05; \*\* significativo ao nível de 0,01; \*\*\* significativo ao nível 0,001.

Diferenças apreciáveis foram evidenciadas entre as diversas espécies de leveduras identificadas na salmoura (Quadro 10). Os coeficientes de correlação de Spearman calculados indicam que a abundância das espécies *C. boidinii*, *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae* está negativamente correlacionada com o valor de pH na salmoura; e positivamente correlacionada com a acidez, à exceção de *C. boidinii*. Estes resultados sugerem que o crescimento de *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae*, durante o processo fermentativo, parece ser favorecido quando os valores de pH são baixos (3,72) e quando os valores de acidez são mais elevados (0,96g de ácido láctico/100 mL de salmoura). Assim, o crescimento destas espécies poderá estar mais dependente/ relacionado com o pH do meio face às restantes espécies de leveduras que também surgiram no meio fermentativo (*D. hansenii*, *G. reessii* e *P. manshurica*). No que concerne à *C. boidinii*, os resultados obtidos sugerem que o seu desenvolvimento é influenciado por valores de pH mais elevados, mas não pela acidez.



# CAPÍTULO 5

---



## 5. Conclusão

O processo de fermentação natural das azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo caracterizou-se por apresentar duas fases distintas. A primeira fase (primeiros 32-54 dias de fermentação) caracterizou-se por um ligeiro aumento da população de leveduras na salmoura e polpa, coincidindo com um acréscimo dos valores de acidez total e conseqüente decréscimo dos valores de pH. No geral, a população de bactérias lácticas e de mesófilos reduziu nesse período. Na segunda fase (restante período) coexistiram em quantidades relativamente constantes bactérias lácticas, microrganismos mesófilos e leveduras e os valores de acidez e pH variaram entre 0,96 a 0,90 g de ácido láctico/100 mL e 3,72-3,46, respetivamente. Nesta fase a população de bolores reduziu de forma significativa atingindo no final o valor mais baixo (1,0 log UFC/g ou mL).

As leveduras foram a população predominante durante todo o processo fermentativo com populações a variar na salmoura entre 5,02 a 6,25 log UFC/mL e na polpa entre 5,07 a 6,47 log UFC/g. As bactérias lácticas ocorreram sobretudo na segunda fase do processo fermentativo atingindo um valor máximo na salmoura e polpa de 5,75 log UFC/mL e 5,43 log UFC/g, respetivamente. A população de mesófilos situou-se entre 3,70 e 5,63 log UFC/mL e 1,90 e 5,82 log UFC/g, respetivamente na salmoura e polpa.

A maioria das colónias de leveduras isoladas eram brancas, circulares, com margem inteira, opacas e com elevação achatada, com diâmetros entre 2 e 15 mm. As estirpes identificadas na salmoura foram as espécies *C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *C. boidinii*, *G. reessii*. Na polpa identificaram-se ainda as espécies *C. norvegica*, *P. guilliermondii*, *R. graminis* e *R. glutinis*. Nesta matriz não foi identificada a espécie *P. manshurica*. Observou-se ainda, durante todo o processo fermentativo, uma maior diversidade de espécies na salmoura face à polpa.

A população de leveduras sofreu alterações ao longo da fermentação das azeitonas. Durante os primeiros 4 dias, registou-se uma elevada abundância de *C. boidinii*, *P. manshurica* e *C. tropicalis* na salmoura e de *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae* na polpa. A partir dos 17 dias e até ao final da fermentação registaram-se, em ambas as matrizes, uma maior abundância de *S. cerevisiae* e *C. tropicalis*. A similaridade da população de leveduras entre a salmoura e a polpa foi reduzida nos primeiros 32 dias de fermentação, apresentando valores superiores a partir dos 44 dias

até ao final da fermentação. Estas diferenças na população de leveduras ao longo do processo de fermentação, com a predominância de determinadas espécies na primeira ou na segunda fase do processo fermentativo, mostraram estar significativamente correlacionadas com a variação dos valores de pH e da acidez da salmoura. Valores de pH baixos e de acidez elevados parecem favorecer o crescimento de *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae*.

Este é o primeiro estudo sobre a evolução da microbiota, em especial das leveduras, na polpa e na salmoura durante o processo fermentativo da “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”. O conhecimento das espécies de leveduras envolvidas na fermentação, a sua evolução ao longo do processo, e as transformações pelas quais são responsáveis poderá ser útil quer na melhoria da qualidade da “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” quer na sua preservação e segurança.

# CAPÍTULO 6

---



## 6. Referências Bibliográficas

- Abbas, C. A. (2006). Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: Querol, A., Fleet, H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer - Verlag, Berlin, 285 - 334.
- Alves, M., C. (2010). Produção industrial de azeitona verde no Algarve: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade do Algarve para obtenção do grau de mestre em Tecnologia dos Alimentos.
- Alves, M.; Gonçalves, T.; Quintas, C. (2012). Microbial quality yeast population dynamics un cracked green table olives fermentations. *Food Control*, **23**, 363 – 368.
- Aponte, M.; Ventrino, 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.; Durán-Quintana, M. C.; Ruiz-Barba, J. L.; Querol, A.; Garrido- Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, **23**, 791 - 796.
- Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Durán-Quintana, M. C.; Rodríguez-Gómez, F.; Romero-Barranco, C.; Garrido-Fernández, A. (2008a). Improvement of the storage process for cracked table olives. *Journal of Food Engineering*, **89**, 479 - 487.
- Arroyo-López, F. N.; Querol, A.; Bautista-Gallego, J.; Garrido-Fernández, A. (2008b). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 189 - 196.
- Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Segóvia-Bravo, K. A.; Garcia-Garcia, P.; Durán-Quintana, M. C.; Romero, C.; Rodríguez-Gómez, F.; Garrido-Fernández, A. (2009). Instability profile of fresh packed "seasoned" Manzanilla-Alorena table olives. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 1629 - 1639.
- Arroyo-López, F. N.; Romero-Gil, V.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Jiménez-Díaz, R.; García-García, P.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms?. *International Journal of Food Microbiology*, **160**, 42 - 49.
- Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L. (2001). *El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, 4ª Edição, Madrid (Espanha). ISBN: 84 – 7114 – 983 – 4.
- Barnet, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. (1990) *Yeasts: Characteristics and identification*. 2<sup>nd</sup> (ed.). University Press, Cambridge.
- 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.

- Brenes, M., Garcia, P.; Garrido, A. (1992). Phenolic compounds related to the black color formed during the elaboration of ripe olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1192-1196.
- Cabezas, J. M. E. (2011). *La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades*. Fotomecánica e impresión: Imprenta tecé, Sevilla.
- Cocolin, L.; Alessandria, V.; Botta, C.; Gorra, R.; De Filippis, F.; Ercolini, D.; Rantsiou, K. (2013). *NaOH-Debittering Induces Changes in Bacterial Ecology during Table Olives Fermentation*. *PLoS ONE* 8 (7): e69074.
- Caderno de especificações da azeitona de Conserva Negrinha de Freixo, disponibilizado em [https://www.google.pt/url?sa=t&rc=tj&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fagriculture%2Fquality%2Fdoor%2FdocumentDisplay.html%3FchkDocument%3D250\\_1\\_pt&ei=g-qFUsezEKvy7AaavYDYDw&usq=AFQjCNFQNdxIx2zc34IL3aXKmp831A23Lg&sig2=rftXkp-UEOickWlSfBw8uw&bvm=bv.56643336,d.ZGU](https://www.google.pt/url?sa=t&rc=tj&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fagriculture%2Fquality%2Fdoor%2FdocumentDisplay.html%3FchkDocument%3D250_1_pt&ei=g-qFUsezEKvy7AaavYDYDw&usq=AFQjCNFQNdxIx2zc34IL3aXKmp831A23Lg&sig2=rftXkp-UEOickWlSfBw8uw&bvm=bv.56643336,d.ZGU). Acedido a 7 de julho de 2012.
- 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.
- Castro, A.; Brenes, M. (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, **36**, 797 - 802.
- Chorianopoulos, N. G.; Boziaris, I. S.; Stamatiou, A.; Nychas, G. J. E. (2005). Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, **22**, 117 - 124.
- COI - Conselho Oleícola Internacional (2012). Key Figures On The World Market For Table Olives. Data adopted at the 100th session of the IOOC (Madrid, Spain), 19 - 23 November <http://www.internationaloliveoil.org/modules/search>. Acedido a 21 de Outubro de 2013.
- 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.
- 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 47/97. <http://dre.pt/pdf1sdip/1997/08/184B00/41624165.pdf>. Acedido a 22 de Outubro de 2013.
- Diário da República, 2.ª série N.º 209, 31 de Outubro de 2011; Aviso n.º 21543/2011. Acedido a 22 de outubro de 2013.

- Estatísticas Agrícolas (2012). Instituto Nacional de Estatística (2012).  
[http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2). Acedido a 21 de Outubro de 2012.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A., (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S. rRNA gene and the two ribosomal *internal transcribed spacers*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, 329–337.
- Fernández, A. G.; Díez, M. J. F.; Adams, M. R. (1997). *Table olives. Production and Processing*. Chapman & Hall. London, UK.
- 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). *Bioteología de la Aceituna de Mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Gráficas Urpe, Madrid (España).
- Fernández, A. G. *et al.* (2005). Tecnología de la elaboración de aceite de oliva y aceitunas de mesa. In: Enciclopedia mundial del olivo. Madrid: Consejo Oleícola Internacional, 13 - 24.
- Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N. & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal Antimicrobial Agents*, **20**, 293 - 296.
- García, P.; Brenes, M.; Garrido, A. (1992). Rapid indirect method for determining the sodium content of table olives. *Analyst*, **117**, 173 - 176.
- Giannino M. L.; Buffoni J. N.; Massone E.; Feligini M. (2011). *Internal transcribed spacer* as a Target to Assess Yeast Biodiversity in Italian Taleggio PDO Cheese. *Journal of Food Science*, **76**, 511 – 514.
- 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.; Garcia, P. G.; Navarro, L. R. (2006). Trends in table olive production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, 86 - 94.
- Groenewald, M.; Robert, V.; Smith, M. Th. (2011). The value of the D1/D2 and *internal transcribed spacers* (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia*, **26**, 40 - 46.
- 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.
- Hernández, A.; Martín, A.; Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, **121**, 178-88.

- Hurtado, A.; Reguant, C.; Esteve-Zarzoso, B.; Bordons, A.; Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Aberquina table olives. *Food Research International*, **41**, 738 - 744.
- Hurtado, A.; Reguant, C.; Bordons, A.; Rozès, N. (2009). Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiology*, **26**, 827 - 833.
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, London.
- ISO 4833:2003-Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms -Colony-count technique at 30 degrees C.
- Janoszka, B. (2010). 7-Ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. *Meat Science*, **86**, 976-984.
- Kanavouras, A.; Gazouli, M.; Leonidas, L. T.; Petrakis, C. (2005). Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, **56**, 106 - 115.
- Kotzekidou, P., (1997). Identification of yeast from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, **14**, 609 - 616.
- Kurtzman C.P., Robnett C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek*, **73**, 331 - 371.
- Kurtzman, C. P.; Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces. *Mycoscience* **51**, 2 – 14.
- Li, W. H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinaeur Associates, Sunderland, MA.
- Marquina, D.; Peres, C.; Caldas, F. V.; Marques, J. F.; Peinado, J. M.; Spencer, M. (1992). Characterization of the yeasts populations in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, **14**, 279 - 283.
- Marsilio, V.; Campestre, C.; Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55 - 60.
- Martin, K. J.; Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers develop for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, **5**, 28.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Blackwell, Oxford
- Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C.; Garcia, A., Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9817 - 9823.

- Mendes, P. (2012). Caracterização da fração fenólica e atividade biológica de azeitonas de mesa ao natural produzidas na região de Trás-os-Montes. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- Mestre, M. C.; Rosa, C. A.; Safar, S. V.; Libkind, D.; Fontenla, S. B. (2001). Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, **78**, 531 - 41.
- Mrak, E. M.; Vaughn, R. H.; Millar, M. W.; Phaff, H. J. (1956). Yeasts occurring in brines during the fermentation and storage of green olives. *Food Technology*, **10**, 416 - 419.
- Nisiotou, A. A.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. J. E.; Panagou, E. Z. (2009). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, **108**, 396 - 405.
- Nogueira, F., Mendes, P., Pereira, J.A., Pereira, E. L. (2012a). Qualidade microbiológica de azeitonas de mesa provenientes de produtores artesanais de Trás-os-Montes. In VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012, *Atas Portuguesas de Horticultura*, nº 21, 335 - 340.
- Nogueira, F., Mendes, P., Pereira, J.A., Pereira, E. L. (2012b). Atividade enzimática de leveduras isoladas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes. In VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012, *Atas Portuguesas de Horticultura*, nº 21: 315-321.
- Nout, M. J. R.; Rombouts, F. M. (2000). Fermented and Acidified Plant Foods, in Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 685 – 737.
- Norma Portuguesa (NP) 3034. (2012). Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Norma Portuguesa (NP) 3034. (1987). Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação
- 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.
- OMAIAA-Observatório dos Mercados Agrícolas e das importações Agro-Alimentares (2010). <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2010/10/07a.htm>. Acedido a 28 de Outubro de 2013.
- Oliveira, M.; Brito, D., Catulo, L.; Leitão, F.; Gomes, L.; Silva, S.; *et al.* (2004). Biotechnology of olive fermentation of “Galega” Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, **55**, 219 - 226.

- Panagou, E. Z.; Tassou, C. C.; Katsaboxakis, C. Z. (2003). Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 667 - 674.
- Panagou, E. Z.; Katsaboxakis, C. Z. (2006) 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.; 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.
- Pereira, A. P, Pereira, J. A. Bento, A., Estevinho, L. M (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2895 – 2902.
- Quintana, D. M. C., González, F., Garrido, A., (1979). Aceitunas negras al natural en salmuera. Ensayos de producción de alambrado. Inoculación de diversos microorganismos aislados de salmueras de fermentación. *Grasas Y Aceites*, **30**, 361 - 367.
- Randazzo, C. L.; Restuccia, C.; Romano, A. D.; Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, **90**, 9 - 14.
- 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.
- Regulamento CEE Nº 2081/92 do Conselho. “Azeitonas de Conserva de Elvas e Campo Maior”. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2005:288:0005:0008:PT:PDF>. Acedido a 21 de Outubro de 2013.
- Regulamento CE nº 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17º do Regulamento (CEE) nº 2081/92 do Conselho. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996R1107:PT:HTML>. Acedido a 3 de Novembro de 2013

- 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.
- Rodrigues, N., M., S., F. (2011). Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade do Algarve para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.
- 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.
- Ruiz-Barba, J. L.; Rios-Sanchez, R. M.; Fedriani-Iriso, C.; Olias, J. M.; Rios, J. L.; Jimenez-Diaz, R. (1990). Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, **13**, 199 - 205.
- Ruiz-Barba, J. L.; Brenes, M.; Jiménez, R.; García, P.; Garrido, A. (1993). Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of brine. *Journal of Applied of Bacteriology*, **74**, 15 - 19.
- Sánchez, A. H., de Castro, A.; Rejano, L., Montaña, A. (2000). Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5975 - 5980.
- Setati, M.E.; Jacobson, D.; Andong, U-C.; Bauer, F. (2012) The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS ONE* 7(12): e52609.
- Silva, T.; Reto, M.; Sol, M.; Peito, A.; Peres, C. M.; Peres, C., Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT – Food Science and Technology*, **44**, 1349 – 1354.
- Schmitt, M. J.; Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology*, **26**.
- Schoch, C. L.; Seifert, K. A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge J. L.; Levesque, C. A.; Chen, W., Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal *internal transcribed spacer* (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Seaby RMH e Henderson PA (2007). Community Analysis Package 4.
- Seaby RMH, Henderson PA (2007). Species Diversity and Richness Version 4.
- 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.
- Spyropoulou, K. E.; Chorianoopoulos, N. G.; Skandamis, P. N.; Nychas, G. J. E. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, **66**, 3-11.

- Tassou, C. C.; Panagou, E. Z.; Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, **19**, 605 - 615.
- 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.
- Vaughn, R. H.; Jakubczyk, T.; MacMillan, J. D.; Higgins, T. E.; Davé, B. A.; Crampton, V. M. (1969). Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology*, **10**, 771 - 775.
- Villa-Carvajal, M., Querol, A., Belloch, C., 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the *internal transcribed spacers* (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **90**, 171 - 181.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, D.H.G. M. A. Innis, J. J. Sninsky & T. J. White, eds, ed (San Diego: Academic Press), 315 - 322.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *Elsevier Science*, Part **IV**, 77 - 100.