



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Azeitona de mesa natural da cultivar
Maçanilha com baixo teor de cloreto
de sódio

Cíntia Estêvão Viegas Correia da Saúde

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Faro, 2014



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Azeitona de mesa natural da cultivar Maçanilha com baixo teor de cloreto de sódio

Cíntia Estêvão Viegas Correia da Saúde

**Trabalho apresentado ao Instituto Superior de Engenharia para
obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos**

Sob orientação:

Professora Doutora Célia Maria Brito Quintas (Orientadora)

Professora Doutora Paula Maria Carrasquinho Pires Cabral (Coorientadora)

Faro, 2014

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Cíntia Estêvão Viegas Correia da Saúde



©2014 Cíntia Estêvão Viegas Correia da Saúde

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

No final desta tese de mestrado, que marca também a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos, não posso deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e entidades que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam, orientaram e ajudaram ao longo do desenvolvimento deste estudo, nomeadamente:

- Dr.^a Célia Quintas pela orientação desta tese, pela sua atenção, dedicação, estímulo e inspiração sobre o tema e transmissão de conhecimentos ao longo do estudo;
- Dr.^a Paula Cabral pela coorientação ao longo do desenvolvimento desta dissertação, pela partilha e transmissão de conhecimentos, pela dedicação, total disponibilidade, apoio incondicional e simpatia com que sempre me abordou;
- A todo o pessoal técnico dos laboratórios de processamento de alimentos, química e microbiologia do Departamento de Engenharia Alimentar, pela atenção, apoio e auxílio incondicional em todos os momentos deste estudo, em especial à Eng^a Vera Gonçalves e à Eng^a Clárisse Ramalho;
- Às minhas colegas de mestrado Tânia Mateus e Tânia Barros pela ajuda incondicional e apoio;
- Aos estagiários Dinis Ramos e David Fialho pela colaboração no trabalho experimental;
- À Universidade do Algarve, Instituto Superior de Engenharia, que proporcionou as condições necessárias para a sua realização;
- Ao painel de provadores, a todos os colegas e funcionários da Área Departamental de Engenharia Alimentar;
- À empresa Hélder Madeira Comércio e Indústria de Azeitonas, Lda, por ter fornecido as azeitonas utilizadas neste estudo.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, sem eles não seria o que sou hoje, e família por todo o apoio, dedicação e compreensão que me deram nesta reta final.

A todos um Muito Obrigado!

Resumo

A azeitona britada da cultivar Maçanilha caracteriza-se pela cor verde, sabor ligeiramente amargo e aroma peculiar. Apesar da qualidade organolética, este produto é fermentado numa salmoura com elevado teor de sal. Foi objeto deste trabalho estudar o efeito da substituição parcial de NaCl por KCl e CaCl₂ na fermentação de azeitona britada, no âmbito da “Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal”. Utilizaram-se diferentes combinações de sais (8 % NaCl; 4 % NaCl e 4 % KCl; 4 % NaCl e 3 % CaCl₂; 4 % KCl e 3 % CaCl₂; e 2,7 % NaCl e 2,7 % KCl e 2,0 % CaCl₂) e no final da fermentação analisaram-se as características nutricionais, físico-químicas e organoléticas da azeitona de mesa e respetiva salmoura. As combinações dos substitutos de NaCl conduziram a valores de pH (4,01-4,20) e acidez livre (0,32-0,59 %) na salmoura e teor de sal (6,6-10,4 %) na azeitona, que estão de acordo com o Trade Standard Applying to Table Olives. A análise sensorial indicou que não há diferenças entre a azeitona fermentada em 8 % NaCl e em 4 % NaCl e 4 % KCl. A azeitona produzida nesta combinação de sais de sódio e potássio é rica em gordura (25,80±1,56 %) e humidade (62,26±1,98 %), tem baixos teores de proteína (1,22±0,01 %), hidratos de carbono (5,46±0,52 %) e cinzas (3,72±0,15 %), a que correspondem 258,91±15,97 kcal/100 g azeitona e uma concentração de sódio de 1975,1 mg/100 g azeitona. A composição nutricional da azeitona fermentada em salmoura com 8 % NaCl é semelhante à anterior, com exceção do maior teor de sódio, de 2513,4 mg/100 g azeitona. A substituição parcial do sódio por potássio na salmoura de fermentação conduziu a uma redução efetiva da quantidade de sódio (21 %) na azeitona de mesa produzida.

Palavras-chave: NaCl, KCl, CaCl₂, Azeitona de mesa Maçanilha, fermentação.

Abstract

Cracked table olives of the Maçanilha cultivar are characterized by a fresh green colour, a slightly bitter taste and peculiar aroma. Despite their organoleptic quality, this product is fermented in high salt content brines. The objective of this work was to study the effect of the partial replacement of NaCl by KCl and CaCl₂, in the fermentation of cracked table olives, in the context of the "Strategy for the reduction of salt intake in Portugal". Different combinations of salts (8 % NaCl; 4 % NaCl and 4 % KCl; 4 % NaCl and 3 % CaCl₂; 4 % KCl and 3 % CaCl₂; 2,7 % NaCl and 2,7 % KCl and 2,0% CaCl₂) were used and, at the end of fermentation, the nutritional, physico-chemical and organoleptic characteristics of table olives and brines were analysed. The salt mixtures resulted in pH and free acidity levels in the brine of 4,01-4,20 and 0,32-0,59 %, respectively and salt concentrations in the olives of 6,6-10,4 % in accordance with the Trade Standard Applying to Table Olives. Sensory analysis indicated that no differences were found between table olives fermented in brines with 8 % NaCl or 4 % NaCl and 4 % KCl. Table olives produced in this mixture are rich in fat (25,80±1,56 %) and humidity (62,26±1,98 %), contain low levels of protein (1,22±0,01 %), carbohydrates (5,46±0,52 %) and ash (3,72±0,15 %), which corresponds to 258,91±15,97 kcal/100 g of olives, and a sodium content of 1975,1 mg/100 g olives. These values are not different from the nutritional composition of table olives fermented in 8% NaCl brine, except for the higher sodium content of 2513,4 mg/100 g olives. The partial replacement of sodium by potassium in the fermentation brine led to an effective reduction in the sodium content (21 %) of the table olives produced.

Keywords: NaCl, KCl, CaCl₂, Table olives of Maçanilha cultivar, fermentation.

Índice Geral

Declaração de autoria de trabalho	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
1.Introdução	1
1.1 Azeitona, morfologia e composição	3
1.2 Azeitona Maçanilha	6
1.3 Definição de azeitona de mesa	7
1.3.1 Classificação das azeitonas de mesa	8
1.3.2 Métodos de preparação.....	11
1.3.3 Produção de azeitona verde britada.....	13
1.4 Condições gerais de qualidade	16
1.5 Sal e os riscos associados	16
1.6 Objetivo	21
2. Materiais e Métodos	23
2.1 Metodologia de produção de azeitona de mesa verde britada	23
2.2 Recolha de amostras	24
2.3 Reagentes.....	25
2.4 Caracterização morfológica da azeitona verde britada.....	26
2.5 Parâmetros físico-químicos	26
2.5.1 Determinação do pH.....	26
2.5.2 Determinação da cor.....	26
2.5.3 Determinação da textura.....	27
2.5.4 Determinação da atividade de água (a_w)	27
2.5.5 Determinação da acidez	27
2.5.6 Determinação de compostos fenólicos totais	28

2.5.7. Determinação de açúcares redutores	29
2.5.8 Determinação de cloretos na salmoura.....	29
2.6 Parâmetros microbiológicos	30
2.7 Análise sensorial.....	30
2.8 Composição nutricional.....	31
2.8.1 Determinação do resíduo seco e teor de humidade.....	31
2.8.2 Determinação do teor em proteína bruta.....	31
2.8.3 Determinação do teor em matéria gorda livre.....	32
2.8.4 Determinação de fibra bruta.....	33
2.8.5 Determinação do teor em cinza.....	34
2.8.6 Determinação dos hidratos de carbono	34
2.8.7 Determinação dos minerais (Na, K e Ca).....	34
2.8.8 Determinação do valor energético.....	35
3. Resultados e Discussão	37
3.1 Evolução da fermentação.....	38
3.1.1 pH e acidez livre na salmoura	38
3.1.2 Açúcares redutores na salmoura.....	39
3.1.3 Salinidade na salmoura.....	40
3.1.4 Características da salmoura e da azeitona no final da fermentação	41
3.2 Caracterização da azeitona de mesa verde britada	46
3.2.1 Morfologia da azeitona de mesa.....	46
3.2.2 Caracterização microbiológica.....	47
3.2.3 Análise sensorial	48
3.2.4 Caracterização física	50
3.2.5 Composição nutricional.....	52
4. Conclusão	58
4.1 Perspetivas de trabalho futuro	60
5. Referências Bibliográficas	62
ANEXOS.....	68

Índice de figuras

1.1	Morfologia de uma azeitona.....	3
1.2	Azeitonas de mesa da cultivar Maçanilha.....	7
1.3	Fluxogramas dos 3 métodos de processamento de azeitonas de mesa com maior expressão económica: a) Método Grego, b) Método Espanhol, c) Método Californiano.....	12
1.4	Azeitona verde britada de cultivar Maçanilha.....	14
1.5	Processo de britagem tradicional da azeitona Maçanilha.....	14
1.6	Fluxograma de produção da azeitona verde britada.....	15
1.7	Ingestão diária de sal por uma determinada população adulta de vários países europeus em 2012.....	18
1.8	Mapa de prevalência de hipertensão arterial, ajustada à estrutura demográfica de cada região de Portugal (prevalência global e por sexo).....	19
2.1	Lavagem inicial das azeitonas.....	23
2.2	Remoção de folhas e/ou pedúnculos das azeitonas.....	23
2.3	Britagem em equipamento de aço inoxidável.....	23
2.4	Parâmetros físico-químicos analisados às amostras frescas.....	25
2.5	Parâmetros físico-químicos analisados às amostras armazenadas.....	25
2.6	Medição de parâmetros biométricos da azeitona utilizando uma craveira.....	26
3.1	Evolução do pH (▲) e da acidez livre (●) das salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação.....	38
3.2	Evolução dos açúcares redutores das salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação.....	40
3.3	Evolução da concentração dos iões cloreto nas salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação da azeitona verde britada.....	41
3.4	pH da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.....	42
3.5	Acidez livre da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.....	43

3.6	Concentração de açúcares redutores da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.....	44
3.7	Concentração de compostos fenólicos totais da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.....	45
3.8	Perfil sensorial da azeitona de mesa fermentada em salmouras com diferentes concentrações iniciais de sais.....	48
3.9	Concentração de minerais (mg / 100 g azeitona) em cálcio, potássio e sódio em azeitonas verdes britadas de cultivar Maçanilha frescas e após fermentação	54

Índice de tabelas

1.1	Classificação da azeitona de mesa quanto ao grau de maturação.....	8
1.2	Classificação das azeitonas de mesa quanto aos processos tecnológicos de produção.....	9
1.3	Classificação das azeitonas de mesa quanto à forma de apresentação.....	10
2.1	Concentrações de NaCl, KCl e CaCl ₂ nas soluções de salmoura utilizadas na fermentação de azeitona verde britada.....	24
2.2	Momentos de amostragem ao longo de 162 dias.....	25
3.1	Parâmetros biométricos da azeitona britada Maçanilha (média ± desvio padrão).....	46
3.2	Dimensões da azeitona (média ± desvio padrão).....	46
3.3	Resultados da análise sensorial a azeitona de mesa fermentada em salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes.....	49
3.4	Análises físicas realizadas às azeitonas inteiras e britadas antes de sofrer processo tecnológico e às azeitonas de mesa fermentadas com diferentes concentrações de sais, média e desvio padrão.....	51
3.5	Composição nutricional de azeitona de mesa fermentada em salmouras de 8 % NaCl e de 4 % NaCl e 4 % KCl, expressa em percentagem (média ± desvio padrão).....	52
3.6	Teor de sal na azeitona de mesa fermentada em salmouras com diferentes combinações de sais (expresso em % NaCl equivalente).....	55
3.7	Nutrientes fornecidos pelo consumo de 8 azeitonas de mesa, expresso em gramas.....	56

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
a_w	Atividade de água
° Brix	Resíduo seco solúvel
c_i	Molaridade do ião i do soluto (mol/L)
DNS	Ácido 3,5- dinitrossalicílico
FI	Força iónica
pH	Potencial de hidrogénio
z_i	Carga do ião i do soluto

Introdução



1.Introdução

A oliveira, *Olea europaea L.*, é uma árvore de fruto comum nos países Mediterrânicos, na Ásia e em África (Kailis & Harris, 2007). Do fruto da oliveira são valorizados dois dos importantes produtos na dieta mediterrânica: o azeite e a azeitona de mesa.

Em Portugal, o olival representa cerca de 336 mil hectares, sendo a maioria (96%) destinada à produção de azeitona para azeite e os restantes 4 % para a produção de azeitona de mesa (Recenseamento Agrícola, 2009).

A azeitona de mesa representa um dos produtos fermentados mais consumidos na Europa, com uma produção anual de cerca de 2 500 000 toneladas, a qual é produzida maioritariamente em Espanha, na Grécia, Itália e em Portugal (COI, 2012).

Existem diferentes cultivares de oliveira cujos frutos são utilizados para produzir azeitona de mesa, tais como, a Maçanilha, a Gordal, a Galega entre outras (Wood, 1998).

No Algarve, destaca-se a produção da cultivar Maçanilha, com cerca de 80 % comparativamente às outras regiões de Portugal (Ministério da Agricultura, 2007). Esta variedade de azeitona é colhida normalmente verde, sendo posteriormente britada e fermentada para obter um alimento que faz parte da cultura gastronómica desta região. É um produto muito apreciado e procurado na restauração devido às suas propriedades organoléticas.

A produção de azeitona de mesa, assenta na utilização de sal (NaCl) como o principal ingrediente do meio fermentativo, apresentando vantagens relevantes como a redução da atividade de água do alimento, aumento da força iónica da solução, redução da solubilidade do oxigénio na água e redução do crescimento da microbiota contaminante diminuindo a deterioração indesejável ou patogénica, assegurando deste modo, a segurança microbiológica do produto final durante o seu armazenamento (Panagou *et al.*, 2011).

No que se refere ao consumo de cloreto de sódio, vários estudos confirmam que a população portuguesa consome em média, cerca de 12 g de sal (NaCl) por dia, excedendo o dobro do limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde (5 g/dia) (Viegas, 2009).

Cerca de 25 % da população mundial sofre de hipertensão e em Portugal a doença afeta 42 % da população, com predominância nas regiões a sul do país (Lourenço, 2009).

Nos últimos anos, têm surgido por parte das autoridades reguladoras, recomendações de saúde pública para reduzir a ingestão de cloreto de sódio, devido ao fato, deste componente estar associado a situações de hipertensão e a doenças cardiovasculares.

A reformulação de alimentos no sentido de promover a diminuição da concentração de NaCl, constitui uma preocupação da medicina preventiva e da indústria alimentar (Graça, 2013). Porém, pode representar riscos potenciais para a segurança alimentar e todas as iniciativas requerem estudos detalhados antes da sua implementação à escala industrial (Sleator & Hill, 2007).

Os efeitos negativos do consumo elevado de cloreto de sódio podem ser superados, substituindo parcialmente, este sal por sais de cloreto de potássio e cloreto de cálcio (Bautista-Gallego *et al.*, 2010, 2011a, 2011b; Panagou *et al.*, 2011; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012; Arroyo-López *et al.*, 2008a). Neste contexto, desenvolveu-se o presente trabalho no âmbito do mestrado em Tecnologia dos Alimentos, que teve como principal objetivo estudar o efeito da substituição parcial de cloreto de sódio por cloretos de potássio (KCl) e de cálcio (CaCl₂) no processo de produção de azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha e nas características físico-químicas e sensoriais do produto final.

1.1 Azeitona, morfologia e composição

O fruto da oliveira tem a estrutura básica de uma drupa oval, possui um tamanho de 2 a 3 cm de largura e comprimento, respectivamente, e é constituído por três tecidos principais: o epicarpo (pele), o mesocarpo (polpa) e o endocarpo (caroço) (Galanakis, 2011) (Figura 1.1).

O epicarpo é um tecido protetor que representa cerca de 1 a 3 % do peso da drupa, é coberto por uma camada de cera que constitui 45 a 70 % do peso da pele. No início do desenvolvimento do fruto, a pele apresenta uma cor verde brilhante devido à concentração de clorofila, mas depois altera-se para verde-claro, amarelo palha, rosa, roxo e preto. A mudança de cor ocorre devido às variações de concentrações dos principais pigmentos da azeitona, tais como, clorofila, carotenóides e antocianinas (Bianchi, 2003).

O mesocarpo é o maior tecido da azeitona e representa 84 a 90 % do peso total do fruto (Ghanbari *et al.*, 2012). Este tecido é constituído essencialmente por água (70 - 75 %) e uma fração lipídica que varia entre 14 a 15 % em azeitonas verdes e cerca de 30 % em azeitonas pretas maduras. Apresenta um teor relativamente baixo de açúcares (3,5 a 6 %), prevalecendo a glucose (1 a 3 % do peso da polpa) e a frutose (0,1 a 1,1 %), proteínas (1,5 a 2,2 %). Contem ainda ácidos orgânicos, nomeadamente ácido oxálico, succínico, málico e cítrico, que podem variar entre 1,2 a 2,1 % do peso da polpa em matéria seca e compostos fenólicos (1 a 3 %), sendo o restante constituído por fibras, vitaminas e minerais (Bianchi, 2003; Conde *et al.*, 2008).

O endocarpo é característico de cada variedade de azeitona e representa cerca de 18 a 22 % do peso da azeitona. O núcleo do caroço contém cerca de 22 a 27 % de óleo, enquanto a casca lenhosa contém apenas 1 %. O tamanho, peso, conformação do caroço, a facilidade de separação do caroço da polpa e a fração da polpa são importantes parâmetros para determinar a qualidade do produto final (Bianchi, 2003).

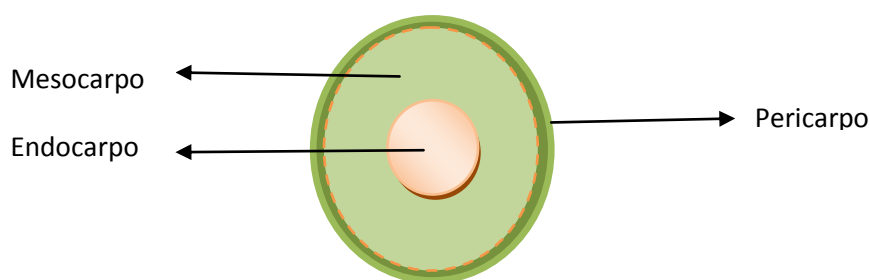


Figura 1.1 Morfologia de uma azeitona.

A colheita do fruto decorre entre Setembro e Dezembro num estado de maturação que depende da cultivar e das características desejadas para o produto final.

O processo de crescimento e amadurecimento da azeitona pode demorar cerca de 5 meses em condições climáticas normais, sendo o tamanho dos frutos influenciado por diversos fatores, como a temperatura, disponibilidade de água e/ou diferenças genéticas entre as cultivares (Ghanbari *et al.*, 2012).

Para a produção de azeitonas de mesa são preferidos os frutos maiores (peso unitário superior a 4 g) e com uma maior quantidade de polpa relativamente ao caroço, no entanto a forma, a cor, o sabor e a textura do fruto também são importantes na aceitação do produto por parte do consumidor final (Ghanbari *et al.*, 2012).

A composição química e as características organoléticas das azeitonas são fatores importantes que determinam a qualidade do produto final e são influenciadas pela cultivar, estado de desenvolvimento e maturação da azeitona, condições edafo-climáticas e métodos de processamento. Os métodos de processamento da azeitona de mesa conduzem a alterações na sua composição química, aumentam os teores de água e sal devido à difusão dos sais da salmoura para os frutos, reduzem o teor em hidratos de carbono, em particular os açúcares solúveis que são consumidos pelos microrganismos durante a fermentação para obtenção de energia e carbono e afetam os constituintes lipídicos, os compostos fenólicos e a composição mineral das azeitonas (Conde *et al.*, 2008).

A textura das azeitonas é diretamente influenciada pelo seu conteúdo em polissacarídeos e substâncias pécnicas. Durante o processamento e armazenamento das azeitonas, as substâncias pécnicas são hidrolisadas por enzimas pectinolíticas ou pectinases, provocando uma diminuição da firmeza do fruto (Bianchi, 2003).

As azeitonas contêm açúcares solúveis (açúcares simples) e polímeros de açúcares (açúcares complexos ou polissacarídeos) incluindo a celulose, hemicelulose ou pectinas e lignina (Kailis & Harris, 2007).

A hemicelulose e a celulose são compostos estruturais das paredes celulares envolvidas por ligações de células adjacentes, contribuindo para a textura e características estruturais das azeitonas. Alterações ou reduções nesses polissacarídeos, durante a maturação ou processamento, podem influenciar as características organoléticas das azeitonas. A celulose existe em quantidades de 3 a 6 % o que constitui uma quantidade substancial de fibras (Kailis & Harris, 2007).

Os açúcares redutores ou totais diminuem (ou desaparecem) até ao cessar das fermentações ou nos primeiros meses de armazenamento. Isto deve-se ao fato de,

durante a fermentação haver uma difusão dos açúcares (compostos fermentáveis) do fruto para o meio (Gómez *et al.*, 2006). Uma vez na salmoura, os açúcares serão utilizados pela microbiota existente como fonte de energia para o seu normal crescimento (Kailis & Harris, 2007). A azeitona possui ainda glicosídeos (incluindo a oleuropeína), que libertam açúcares solúveis, quando hidrolisados, podendo ser uma fonte adicional de açúcares para a fermentação. A hidrólise dos glicosídeos é normalmente lenta e pode ocorrer após fermentação podendo provocar a formação de espumas e problemas de estabilidade (Kailis & Harris, 2007).

Quanto à composição lipídica, a azeitona de mesa apresenta uma composição similar à do azeite, predominando ácidos gordos monoinsaturados como o ácido oleico, o ácido palmítico e o ácido linoleico, sendo o ácido oleico o ácido gordo mais abundante nas azeitonas de mesa. Contudo, o teor em ácidos gordos saturados, que se encontra na forma de triglicéridos, é inferior a 15 % do total de lípidos.

As azeitonas contêm uma grande variedade de compostos fenólicos (metabolitos secundários presentes em todos os produtos de origem vegetal), que desempenham um papel importante nas propriedades organolépticas (cor, aroma, sabor e textura) (Marsilio *et al.*, 2001), químicas, nutricionais (Rodríguez *et al.*, 2009), antioxidantes (Othman *et al.*, 2009) e antimicrobianas (Sousa *et al.*, 2006).

As classes mais importantes de compostos fenólicos em azeitonas de mesa, incluem ácidos fenólicos (p. ex. ácido cafeico), álcoois fenólicos (p. ex. hidroxitirosol, tiosol), flavonoides (p. ex. rutina) e secoiridoides (p. ex. oleuropeína). A oleuropeína é o principal responsável pelo sabor amargo das azeitonas e a sua concentração vai diminuindo ao longo da maturação e durante o processamento da azeitona. Paralelamente o teor de hidroxitirosol vai aumentando, tornando-se o composto fenólico maioritário nas azeitonas de mesa, bem como o tiosol, a rutina, o ácido cafeico, entre outros (Romero *et al.*, 2004).

Existem estudos que comprovam que alguns compostos fenólicos desempenham um papel fundamental na fermentação devido às suas propriedades antimicrobianas, especialmente contra bactérias lácticas em salmoura (Nout & Rombouts, 2000, Medina *et al.*, 2007). Por sua vez, os compostos fenólicos podem oxidar e provocar escurecimento das azeitonas devido à presença de polifenol oxidases (Marsilio *et al.*, 2001).

O consumo de polifenóis é benéfico para a saúde humana, uma vez, que a sua atividade antioxidante contribui para prevenção de várias doenças, tais como, o cancro, a diabetes e as doenças cardíacas, resultante da proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Othman *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2006).

Nutricionalmente as azeitonas contêm baixo teor em proteínas solúveis e insolúveis. As proteínas solúveis podem-se difundir na salmoura, fornecendo aminoácidos para os organismos fermentativos (Kailis & Harris, 2007).

A azeitona contêm pigmentos, tais como, clorofila a e b (cor verde), carotenoides e hidrocarbonetos triterpénicos (cor amarela) e antocianinas (cor violeta-preto). Inicialmente a clorofila é o maior pigmento na azeitona desempenhando um papel fundamental na fotossíntese. Quando o fruto amadurece os níveis de clorofila diminuem enquanto os níveis de outros pigmentos aumentam (Kailis & Harris, 2007).

As azeitonas de mesa são boas fontes de minerais, contêm quantidades razoáveis de potássio, fósforo, sódio, cálcio, magnésio, entre outros. Os teores destes minerais dependem da cultivar, do estado de maturação do fruto e do processo tecnológico utilizado na produção de azeitona de mesa (Kailis & Harris, 2007).

As principais cultivares de azeitona utilizadas na produção de azeitonas de mesa são a Gordal (*Olea europaea* regalis), Clemente (também conhecida por Gordal Sevilhano) e a Maçanilha (*Olea europaea* pomiformis) (Wood, 1998).

1.2 Azeitona Maçanilha

A cultivar Maçanilha é conhecida por vários nomes, Maçanilha em Portugal (Algarve), “Manzanilla” em Espanha (Sevilha) ou “Manzanillo” designação utilizada em Itália. Esta cultivar é oriunda de Espanha, mais concretamente de Sevilha. O nome (pequena maçã em Espanhol) é devido à sua forma ser semelhante à de uma maçã, pesando em média 3,5 a 5,0 gramas (Foods from Spain, 2013). Esta azeitona é colhida entre meados de Setembro e Novembro e é consumida em ambos os estados de maturação, verde (cor verde) ou maduro (cor negra), dependendo da região e da cultura. Pode ser utilizada para produção de azeite, apresentando um rendimento em azeite bastante razoável, e para a produção de azeitona de mesa.

A Maçanilha é uma cultivar cujos frutos são suscetíveis de sofrer danos, feridas ou manchas durante a colheita ou transporte (Kouraba *et al.*, 2004). Estes danos ou feridas expõem os conteúdos celulares proporcionando a entrada de microrganismos (patogénicos ou não) para o interior do fruto e reações de oxidação, levando à sua deterioração e consequentemente redução do seu valor comercial (Eskin & Robinson,

2001). A integridade da azeitona de mesa é um dos fatores determinantes na aceitação do produto final por parte dos consumidores.

É importante que na colheita e transporte, as azeitonas sejam manuseadas com alguns cuidados de modo a não ocorrerem possíveis deteriorações.

As azeitonas de mesa da cultivar Maçanilha (Figura 1.2) são frequentemente utilizadas na restauração como aperitivos, mas também como tempero em pratos de carne, saladas, pizzas, pão de azeitonas, entre outros. São muito apreciadas pelos consumidores devido ao seu sabor característico e delicado e às suas características morfológicas.



Figura 1.2 Azeitonas de mesa da cultivar Maçanilha.

1.3 Definição de azeitona de mesa

Segundo o Trade Standard Applying to Table Olives (COI, 2004), entende-se por “Azeitonas de mesa” o produto preparado a partir de frutos são de cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), escolhidos para produzir azeitonas cujo volume, forma, proporção de polpa em relação ao caroço e características do fruto, nomeadamente, firmeza da polpa, sabor, textura e facilidade de separação do caroço se tornam particularmente adequados para o seu processamento.

Ainda de acordo com Trade Standard Applying to Table Olives (COI, 2004) as azeitonas são submetidas a tratamentos tecnológicos para remover o amargor natural que possuem (causado pela presença abundante de oleuropeína) através de tratamentos alcalinos, imersão em meio líquido, ou processos biológicos e para aquisição de sabor, textura, cor e aromas característicos. As azeitonas podem ser conservadas por

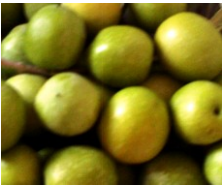


fermentação natural ou por tratamento térmico, com ou sem conservantes e acondicionados com ou sem meio líquido, para assegurar a sua estabilidade e evitar a deterioração do produto final.

1.3.1 Classificação das azeitonas de mesa

Existem diferentes tipos ou classificações de azeitonas de mesa que dependem, sobretudo, do grau de maturação, do processo de preparação e da sua forma de apresentação.

O Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004), entidade que a nível internacional regula o sector dos azeites e da azeitona de mesa, considera três tipos de azeitona de mesa, consoante o seu grau de maturação (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificação da azeitona de mesa quanto ao grau de maturação.

Grau de maturação			
	Azeitona	Colheita	Cor
	Verde	Durante o período de amadurecimento e após terem atingido o tamanho normal.	Pode variar desde verde a amarelo-palha.
	Preta	Momento em que as azeitonas atingiram a maturação completa ou ligeiramente antes de a atingir.	Pode variar desde negro-avermelhado a castanho-escuro, passando por tons violáceos
	Mista	Durante a fase de mudança de cor, antes de atingirem a completa maturação.	Pode variar desde tons rosados a tons acastanhados.




A classificação anterior apenas diz respeito ao tipo de azeitonas que estão na origem da azeitona de mesa. Contudo, este Conselho também classifica as azeitonas de mesa de acordo com o processo tecnológico que lhe deu origem (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 Classificação das azeitonas de mesa quanto aos processos tecnológicos de produção.

Azeitona	Processo tecnológico
	<p>Verde, mista ou preta ao natural</p> <p>São diretamente colocadas em salmoura, onde ocorre fermentação parcial ou total e conservadas ou não por adição de conservantes.</p>
	<p>Verde, mista ou preta tratada</p> <p>São submetidas a um tratamento alcalino e embaladas em salmoura, onde ocorre fermentação parcial ou total, conservadas ou não por adição de conservantes.</p>
	<p>Verde, mista ou preta desidratada ou enrugada</p> <p>São submetidas ou não a um tratamento alcalino, conservadas em salmoura ou parcialmente desidratadas em sal e/ou por aquecimento ou outro tipo de processo tecnológico.</p>
	<p>Verde ou mista escurecida por oxidação</p> <p>São conservadas em salmoura, ocorrendo ou não fermentação, escurecidas por oxidação com ou sem meio alcalino, devendo ser conservadas em recipientes herméticos e submetidas a um processo de esterilização por calor.</p>
	<p>Especialidades</p> <p>Azeitonas de mesa preparadas segundo outros métodos, distintos dos anteriores. Pode-se considerar como exemplo, a azeitona verde britada.</p>

Ainda de acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI 2004) as azeitonas de mesa podem ser classificadas quanto à sua forma de apresentação (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Classificação das azeitonas de mesa quanto à forma de apresentação.

Azeitona	Forma de apresentação	
<p>Inteira, conformação natural, não descaroçada com ou sem pedúnculos.</p>	<p>Britada – azeitonas são submetidas a um processo de quebra da polpa no qual o caroço permanece inteiro e intacto.</p> <p>Retalhada – azeitonas sofrem um corte longitudinal na pele e numa parte da polpa.</p>	
<p>Descaroçada, conformação natural, à qual foi retirado o caroço.</p>	<p>Dividida – azeitonas cortadas em duas partes aproximadamente iguais, podem ser ou não recheadas.</p> <p>Em quartos – azeitonas divididas em quatro partes aproximadamente iguais.</p> <p>Em fatias – azeitonas divididas em mais de quatro partes aproximadamente iguais.</p> <p>Picadas – azeitonas desprovidas de forma definida ou de fragmentos em fatias.</p> <p>Quebradas – azeitonas acidentalmente quebradas enquanto são descaroçadas, podem ser recheadas.</p>	 
<p>Recheada – azeitonas descaroçadas e recheadas com diversos produtos, tais como: pimento, cebola, amêndoas, aipo, limão, laranja, ânchova, avelã, azeitonas ou pasta de azeitonas.</p>		
<p>Pasta de azeitona – produzida a partir da polpa da azeitona triturada.</p>		

1.3.2 Métodos de preparação

O processo de produção de azeitona de mesa assenta fundamentalmente em conhecimento empírico, tradição, transferência intergeracional de sabores, e nas características do produto final desejado. Esta produção surgiu na região Mediterrânica e é uma das mais antigas aplicações biotecnológicas no processamento de alimentos.

O processamento das azeitonas tem como principais objetivos a remoção do amargor dos frutos por hidrólise dos compostos fenólicos, especialmente oleuropeína (Aponte *et al.*, 2010) e aquisição de sabores, textura e aromas específicos e distintos de produtos fermentados noutras regiões (Campaniello *et al.*, 2005). Existem vários métodos de processamento, distintos de região para região (Arroyo-López *et al.*, 2008b), que podem resultar em diferentes tipos de fermentações, mas devem-se principalmente à atividade microbiológica existente, essencialmente *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido lácticas e leveduras, que conduzem a modificações no aroma, sabor e qualidade do produto final (Bautista-Gallego *et al.*, 2011c).

Os métodos de processamento de azeitonas de mesa mais comuns são o método Grego de produção de azeitonas de fermentação natural, o método Californiano de produção de azeitonas pretas oxidadas e o método Espanhol ou Sevilhano de produção de azeitonas verdes (Figura 1.3) (Malheiro *et al.*, 2012; Bautista-Gallego *et al.*, 2011c; Ghanbari *et al.*, 2012). A escolha do método de processamento deverá ter em conta a cultivar, o estado de maturação do fruto, a tecnologia de transformação e aspetos culturais (Dabbou *et al.*, 2012).

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

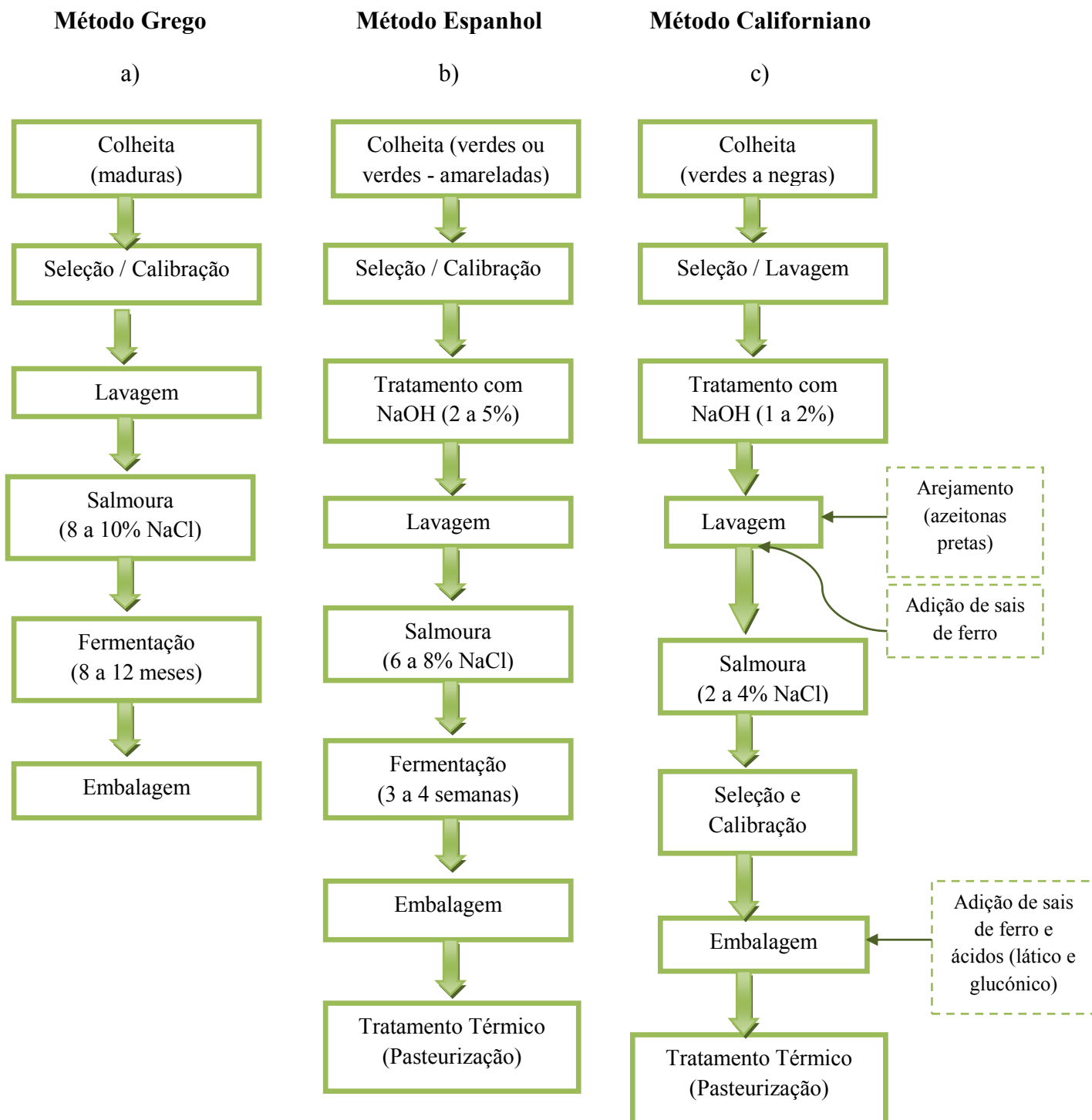


Figura 1.3 Fluxogramas dos 3 métodos de processamento de azeitonas de mesa com maior expressão económica: a) Método Grego, b) Método Espanhol, c) Método Californiano (Adaptado de Gómez *et al.*, 2006; Hutkins, 2006; Arroyo-López *et al.*, 2008b; Panagou *et al.*, 2008; Ghanbari *et al.*, 2012).

Para além destes 3 tipos de processamento de azeitona de mesa (método grego, espanhol e californiano) existem outros processos com menor expressão económica mas característicos de determinadas regiões. Em Portugal, a azeitona galega é fermentada naturalmente sendo uma das azeitonas de mesa mais características do nosso país. Por outro lado, no Algarve, as azeitonas de mesa mais populares são a azeitona verde britada de cultivar Maçanilha e a azeitona madura desidratada em camadas de sal.

1.3.3 Produção de azeitona verde britada

A azeitona britada caracteriza-se por ter uma cor verde natural, um aroma rico e um sabor amargo típico (Alves *et al.*, 2012). Os frutos são colhidos antes de amadurecerem e são submetidos a um processo de fermentação de modo a eliminar parcialmente o sabor amargo característico destes frutos (Fernández *et al.*, 1997). As azeitonas são diretamente colocadas em salmoura e são conservadas por fermentação natural (COI, 2004).

Estes frutos sofrem uma fermentação “espontânea” realizada pela microbiota autóctone, onde as leveduras têm um papel determinante (Alves *et al.*, 2012).

As azeitonas produzidas por fermentação natural são apreciadas pela maioria dos consumidores, devido às suas características organoléticas e por serem um “produto natural”. O seu sabor é completamente diferente das azeitonas tratadas com NaOH, sobretudo devido ao sabor amargo residual que se mantém depois de um longo período em salmoura.

No Algarve, as azeitonas verdes da cultivar Maçanilha sofrem um processo de britagem (Figura 1.4), método mais popular e tradicional de produzir azeitonas de mesa. Tradicionalmente e para consumo próprio, as azeitonas são partidas com uma pedra (Figura 1.5) e colocadas em salmoura de forma a diminuir o sabor amargo das mesmas. Atualmente, no mercado já existem equipamentos de britagem em aço inoxidável utilizados principalmente nas indústrias de produção de azeitona de mesa.

A salmoura é preparada, normalmente, com sal marinho característico da costa Algarvia e água isenta de cloro.

Após a fermentação, as azeitonas verdes britadas são temperadas com diversos condimentos, tais como, alho, limão, nêveda, orégãos, tomilho ou louro.



Figura 1.4 Azeitona verde britada de cultivar Maçanilha.



Figura 1.5 Processo de britagem tradicional da azeitona Maçanilha.

O processamento da azeitona verde britada apresenta-se no fluxograma (Figura 1.6) que se divide em três etapas principais. A primeira etapa inclui a colheita, seleção, calibração, britagem e lavagem de modo eliminar possíveis impurezas existentes, diminuir a atividade microbiana e reduzir a concentração de compostos fenólicos (p. ex. oleuropeína), contribuindo para a diminuição do sabor amargo do fruto (Arroyo-López *et al.*, 2007). A segunda etapa consiste na colocação das azeitonas em salmoura e o início da fermentação, enquanto a terceira etapa compreende as fases de tempero das azeitonas e embalamento.

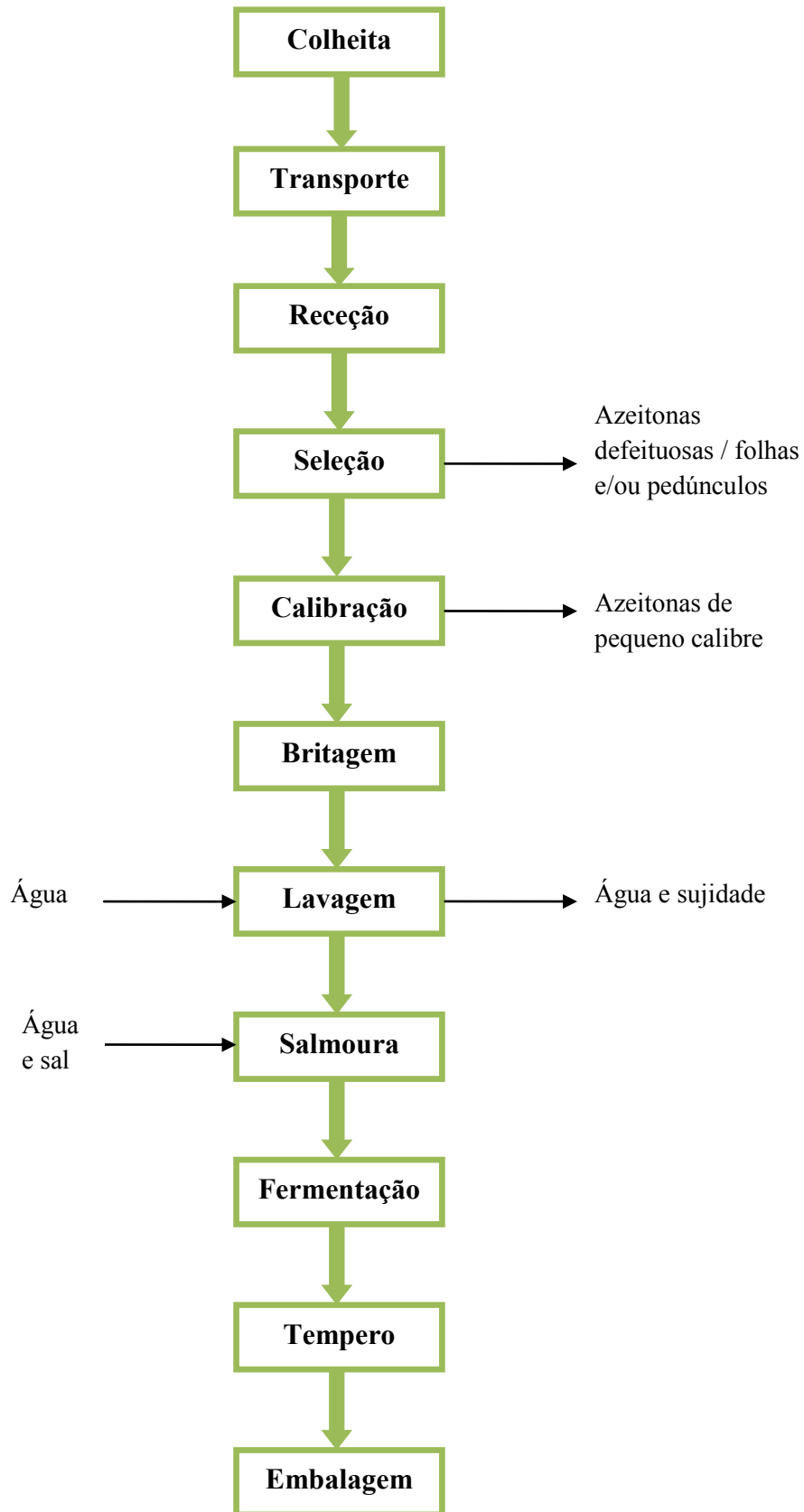


Figura 1.6 Fluxograma de produção da azeitona verde britada.

1.4 Condições gerais de qualidade

As azeitonas de mesa devem apresentar-se sadias, limpas, livres de corpos estranhos, isentas de sabor e odor anormal, com maturação adequada e isentas de defeitos que possam torná-las impróprias para consumo ou afetar a sua conservação. Além disso, as azeitonas de mesa não devem apresentar sinais de degradação ou de fermentação anormal (*Codex Alimentarius*, 1981).

Segundo o Trade Standard Applying to Table Olives, as salmouras da azeitona de mesa natural deve ter um pH \leq a 4,3 e uma acidez livre superior a 0,3 % (expresso em ácido láctico) (COI, 2004). As salmouras deverão manter-se limpas, isentas de sabores e odores anormais e de substâncias estranhas não autorizadas.

O número de microrganismos (bactérias lácticas e/ou leveduras) num meio de cultura seletivo não deve ser superior a 10^9 unidades formadoras de colónia por mL de salmoura ou polpa de azeitona dependendo do tipo de fermentação (COI, 2004).

O produto final não deve conter microrganismos patogénicos, toxinas ou parasitas, que ponham em risco a saúde do consumidor (COI, 2004).

1.5 Sal e os riscos associados

A fermentação e o armazenamento em salmoura são sistemas tradicionais de conservação de alimentos devido ao baixo consumo de energia. A utilização de cloreto de sódio, principal constituinte da salmoura, diminui a atividade da água no alimento, o que contribui para controlar o crescimento e/ou desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e melhorar o seu sabor, cor e textura, tornando assim os alimentos saborosos e atrativos (Ross *et al.*, 2002).

O cloreto de sódio é, talvez, o condimento e/ou conservante natural mais antigo usado pelo Homem.

O sódio (Na) é um micronutriente essencial ao organismo, é fundamental para o equilíbrio ácido-base quando associado ao cloro, sob a forma de cloreto de sódio. A sua principal função consiste na manutenção da pressão osmótica do meio extracelular evitando uma perda excessiva de água, tendo também um papel importante na condução dos impulsos nervosos e na contração muscular (Almeida, 1997).

O consumo de sal tem aumentado nas últimas décadas, nomeadamente através do aumento da produção e da disponibilidade de “snacks” ricos em sal, pão, queijo, refeições pré-confeccionadas, refeições realizadas fora de casa e alimentos proteicos de origem animal (Europaean Comission, 2008).

Quando a ingestão de sódio excede as necessidades do organismo existem mecanismos de controlo que funcionam de forma a manter o normal conteúdo de sódio nos fluidos corporais. No entanto, existe um limite superior abaixo do qual se pode eliminar sódio, pelo que uma ingestão para além deste limite, provoca retenção de água. Quando a ingestão excessiva for mantida por longos períodos de tempo, podem ocorrer alterações irreversíveis nos mecanismos de controlo, provocando danos e falhas nos tecidos, considerando-se que uma das manifestações que resulta destes danos é a hipertensão arterial (Viegas, 2008).

O consumo excessivo de sal está associado a patologias crónicas, tais como, hipertensão arterial, o acidente vascular cerebral, a doença coronária isquémica, a insuficiência cardíaca, a obesidade, a diabetes, a asma, a osteoporose, doenças renais, entre outras (Costa & Bragança, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um nível de consumo de sal da população de menos de 5 gramas por pessoa por dia para a prevenção de doenças cardiovasculares. Contudo, a ingestão de sal na maioria dos países da União Europeia está muito acima da quantidade sugerida, como se pode observar na Figura 1.7 (Graça, 2013). Em Portugal, o consumo de sal é sensivelmente o dobro do recomendado pela OMS, além disso, é um dos países da Europa que apresenta maior taxa de mortalidade provocada por acidente vascular cerebral, sendo a hipertensão arterial um dos fatores de risco mais relevantes (Graça, 2013).

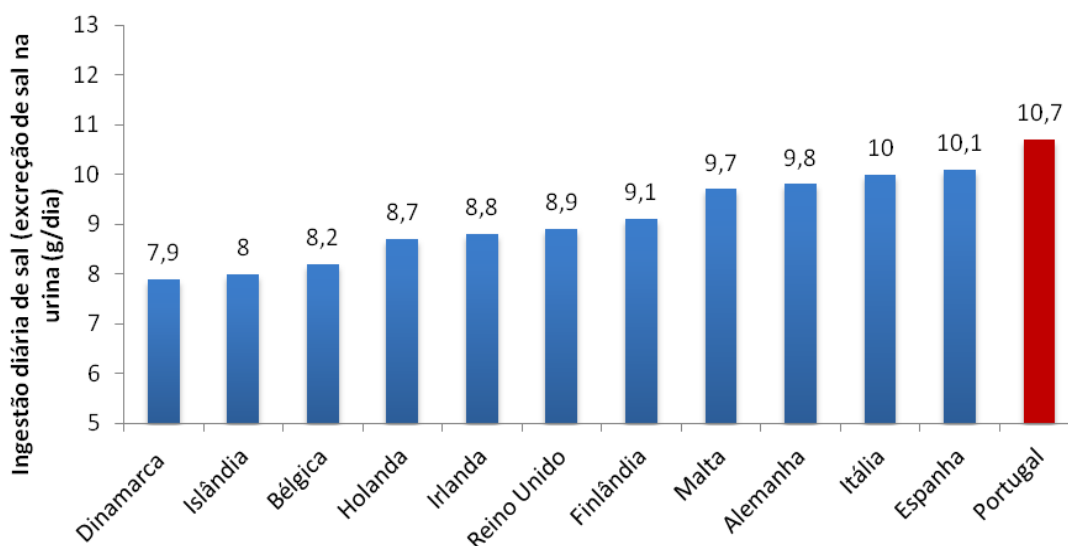


Figura 1.7 Ingestão diária de sal por uma determinada população adulta de vários países europeus em 2012 (Adaptado de Graça, 2013).

O Alentejo, as regiões do Centro e o Algarve são as regiões do país que apresentam maior prevalência de hipertensão arterial (Macedo, *et al.*, 2007) como se pode observar na Figura 1.8.

O plano de ação correspondente a 2013-2020 da OMS na área da Alimentação e Nutrição, sugere estratégias para reduzir a ingestão de sal como uma das melhores abordagens para a prevenção de doenças crónicas na população (Graça, 2013).

Reduzindo 15 % do consumo de sal, evitar-se-iam 8,5 milhões de mortes em todo o mundo (Lourenço, 2009).

Uma das estratégias para reduzir o consumo de sal e os seus efeitos negativos na saúde é reformular a composição de produtos alimentares em colaboração com a indústria alimentar e a restauração, requerendo deste modo, a realização prévia de estudos para avaliar a aceitabilidade dos produtos alimentares por parte dos consumidores, dando-lhes viabilidade no mercado.

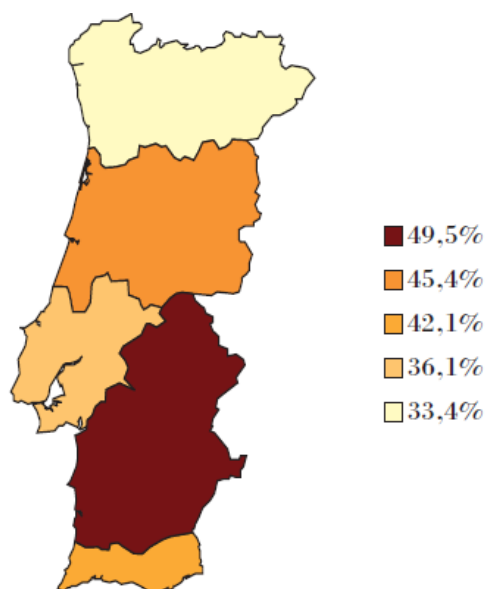


Figura 1.8 Mapa de prevalência de hipertensão arterial, ajustada à estrutura demográfica de cada região de Portugal (prevalência global e por sexo) (Macedo *et al.*, 2007).

Os alimentos fermentados de origem vegetal possuem um determinado teor de cloreto de sódio. Os efeitos negativos do consumo elevado de cloreto de sódio podem ser superados, substituindo parcialmente, este sal por sais de cloreto de potássio e cloreto de cálcio, de modo a não alterar substancialmente o perfil normal do processo de fermentação dos alimentos.

Uma alimentação com baixo teor em sódio e rica em potássio (K) e cálcio (Ca) é recomendada para reduzir a pressão arterial (Leiba *et al.*, 2005). Além disso, uma alimentação rica em cálcio apresenta um efeito protetor contra a osteoporose e o cancro do colón (Berner *et al.*, 1990).

Os minerais cloreto de cálcio e cloreto de potássio estão entre os permitidos pela União Europeia na preparação de alimentos ou suplementos alimentares (Decreto-Lei n.º 136/2003).

O impacto na saúde do consumo de azeitona de mesa com elevado teor de sódio é limitado, porque a azeitona de mesa é consumida em pequena proporção na dieta alimentar, mas é evidente que uma composição mais saudável no conteúdo mineral possa contribuir para melhorar a alimentação e a saúde do consumidor, assim como a imagem de produtos fermentados em salmoura, como é o caso da azeitona de mesa (Bautista-Gallego *et al.*, 2011a).

Existem vários estudos sobre a substituição total ou parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio e cloreto de cálcio, na fermentação de azeitona de mesa processada de acordo com estilos diferentes (Bautista-Gallego *et al.*, 2010, 2011a,

2011b; Panagou *et al.*, 2011; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012; Arroyo-López *et al.*, 2008a). No entanto, não há referências de que este tipo de estudo se tenha realizado em azeitona de mesa portuguesa.

O cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl₂) são sais de sabor amargo e salgado e podem ser misturados com cloreto de sódio para melhor o sabor dos alimentos. Estes sais são considerados aditivos alimentares permitidos na União Europeia (E508 – cloreto de potássio; E 509 – cloreto de cálcio) (Regulamento (UE) n.º 1129/2011), normalmente utilizados como substitutos de cloreto de sódio, suplementos dietéticos, reguladores de acidez e agente de firmeza (somente o cloreto de cálcio), em muitos processos de fabrico de produtos alimentares (Portaria n.º 646/1993).

Na produção de azeitona de mesa, o KCl promove uma atividade microbiana, em geral, mais intensa, em comparação com CaCl₂ (Bautista-Gallego *et al.*, 2011a).

Na produção de azeitona de mesa, o CaCl₂ reduz o crescimento de *Enterobacteriaceae*, leveduras e bactérias ácido lácticas (Bautista-Gallego *et al.*, 2011a).

Segundo Bautista-Gallego *et al.* (2011a) a presença de CaCl₂ no meio fermentativo leva à diminuição do pH inicial e após fermentação (em equilíbrio com frutos alcalinos tratados) e retarda a difusão de açúcares redutores.

Por outro lado, a presença do íon de cálcio (Ca²⁺) durante o armazenamento de azeitona britada de cultivar Manzanilla-Aloreña pode prevenir o amolecimento e contribuir para a manutenção da aparência fresca das azeitonas (Arroyo-López *et al.*, 2008a).

Segundo Panagou *et al.* (2011), o aumento da concentração de CaCl₂ ou a combinação deste sal com KCl torna o produto amargo com pouca aceitação por parte dos provadores. Estes autores referem ainda que, a combinação de sais de cloreto de sódio e de potássio pode produzir azeitonas com baixo teor de sódio e boas propriedades organoléticas.

1.6 Objetivo

Por forma a alterar o processo de produção da azeitona de mesa para obter um produto final distinto, robusto em termos de saúde pública, nutricionalmente rico e de qualidade organolética consistente, com potencial de expansão para novos mercados, o objetivo do presente trabalho foi estudar a produção de azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha com baixo teor de cloreto de sódio. Para tal, investigou-se o efeito de determinadas concentrações de sais de sódio, potássio e cálcio na evolução do processo fermentativo e na qualidade da azeitona de mesa obtida.

Este trabalho vai ao encontro dos objetivos da “Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal” (Graça, 2013) que a seguir se enunciam:

- a) Implementar sistemas de avaliação da ingestão e monitorizar a oferta de sal nos alimentos;
- b) Promover a sensibilização e a capacitação dos consumidores para um consumo reduzido de sal;
- c) Promover a melhor forma de disponibilizar rotulagem capaz de destacar o conteúdo de sal dos alimentos e identificar produtos com pouco sal;
- d) Reformular e disponibilizar produtos alimentares com menor conteúdo de sal.

Materiais e Métodos



2. Materiais e Métodos

2.1 Metodologia de produção de azeitona de mesa verde britada

As azeitonas da cultivar Maçanilha foram colhidas manualmente em meados de Outubro por produtores da região de Tavira e transportados até à fábrica Helder Madeira Comércio e Indústria de Azeitonas, Lda (Tavira). Neste estabelecimento procedeu-se à britagem das azeitonas.

O processamento iniciou-se com uma lavagem com água da rede, previamente desprovida de cloro por filtração (Figura 2.1) As azeitonas passaram por um despedunculador para remoção de pedúnculos e folhas (Figura 2.2), em seguida foram calibradas num calibrador vibratório, onde foram removidas as azeitonas demasiado pequenas, as quais são direcionadas para a produção de azeite. As azeitonas foram posteriormente escolhidas manualmente para remover as azeitonas com defeitos.

A britagem foi realizada num equipamento adequado, por esmagamento entre duas placas de aço inoxidável (Figura 2.3). Após a britagem, as azeitonas foram lavadas, pesadas e imersas em salmoura a 2 %, sendo transportadas de imediato para o laboratório de processamento do Instituto Superior de Engenharia (Universidade do Algarve).



Figura 2.1 Lavagem inicial das azeitonas.



Figura 2.2 Remoção de folhas e/ou pedúnculos das azeitonas.



Figura 2.3 Britagem em equipamento de aço inoxidável.

No laboratório, as azeitonas foram escorridas e imersas em soluções de salmoura (Tabela 2.1). Cada fermentador continha 8 kg de azeitona e 7,4 L de salmoura, volume suficiente para manter a azeitona completamente imersa.

O cloreto de sódio (NaCl), sal normalmente utilizado na preparação de salmoura, foi parcialmente ou totalmente substituído por cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl₂) a diferentes concentrações, como resume a tabela 2.1.

Tabela 2.1 Concentrações de NaCl, KCl e CaCl₂ nas soluções de salmoura utilizadas na fermentação de azeitona verde britada.

Salmoura	[NaCl]		[KCl]		[CaCl ₂]		FI Total	<i>a_w</i> Inicial	pH Inicial
	(%)	FI ^a	(%)	FI	(%)	FI			
1	7,96	1,362	0,00	0,000	0,00	0,000	1,36	0,955 ± 0,001	6,53 ± 0,05
2	3,98	0,681	3,98	0,534	0,00	0,000	1,22	0,956 ± 0,001	6,43 ± 0,01
3	3,98	0,681	0,00	0,000	2,99	0,807	1,49	0,958 ± 0,000	6,28 ± 0,01
4	0,00	0,000	3,98	0,534	2,99	0,807	1,34	0,969 ± 0,000	6,39 ± 0,02
5	2,65	0,453	2,65	0,356	2,00	0,543	1,35	0,965 ± 0,000	6,24 ± 0,04

^a Força Iónica (FI) $FI = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$

onde *c_i* é molaridade (mol/L) do ião *i* do soluto e *z_i* é a carga do ião

Os ensaios de fermentação de azeitona foram realizados em duplicado e os fermentadores foram mantidos à temperatura de 18,9 °C, durante um período de 162 dias.

2.2 Recolha de amostras

As amostras de salmoura foram retiradas dos respetivos fermentadores em intervalos de tempo regulares (Tabela 2.2), de forma a acompanhar a evolução do processo fermentativo. As amostras de azeitona foram retiradas no início de fermentação e após 162 dias. A amostragem foi realizada em ambiente asséptico para se proceder às análises microbiológicas e físico-químicas.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia, porém não estão descritas neste relatório por não fazerem parte dos objetivos do presente trabalho.

Tabela 2.2 Momentos de amostragem ao longo de 162 dias.

	Tempo (dia)										
Amostras	0	4	11	18	24	36	50	79	92	128	162
Salmoura	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Azeitona	✓										✓

As amostras de salmoura foram recolhidas para tubos *Falcon* de 50 mL e as de azeitona foram colocadas em sacos estéreis e selados a vácuo. Foram realizadas de imediato análises às amostras frescas (Figura 2.4) ou após conservação em câmara congeladora a -80 °C. (Figura 2.5).

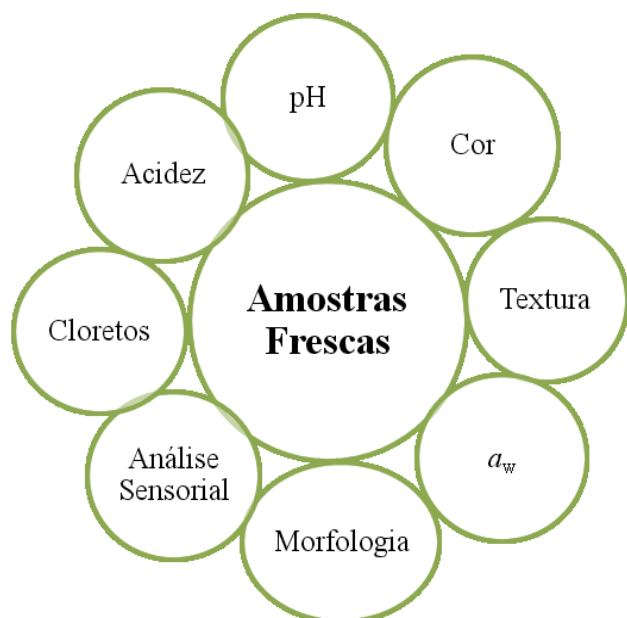


Figura 2.4 Parâmetros físico-químicos analisados às amostras frescas.



Figura 2.5 Parâmetros físico-químicos analisados às amostras armazenadas.

2.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados eram analiticamente puros e de várias fontes comerciais.

2.4 Caracterização morfológica da azeitona verde britada

A caracterização morfológica da azeitona de mesa baseou-se na análise dos seguintes parâmetros: massa do fruto, massa do caroço; fração edível; dimensões do fruto (diâmetro e comprimento) e diâmetro do caroço. Os parâmetros morfológicos foram medidos utilizando uma amostra de 50 azeitonas, escolhidas aleatoriamente. As massas foram obtidas por pesagem em balança analítica (Mettler, AE 200) e as dimensões usando uma craveira, conforme se pode ver na Figura 2.6.



Figura 2.6 Medição de parâmetros biométricos da azeitona utilizando uma craveira.

2.5 Parâmetros físico-químicos

2.5.1 Determinação do pH

A determinação de pH foi realizada, através da medição direta num potenciômetro (Crison, pH meter GLP 21) em azeitona previamente triturada, utilizando uma sonda para semi-sólidos e na salmoura utilizando uma sonda para líquidos. Foram realizadas três leituras de cada amostra em fresco.

2.5.2 Determinação da cor

A cor da azeitona fresca e processada foi estudada através dos parâmetros L , a luminosidade, que varia de 0 (preto) a +100 (branco); a que varia de -100 a +100 para os tons de verde a vermelho, respetivamente; b que varia de -100 a +100 para os tons de azul a amarelo, respetivamente. Utilizou-se um colorímetro de geometria d/8 (Dr. Lange Spectro-colour, Germany), na escala *Hunter Lab*, com fonte de luz de D_{65} e ângulo de observação 10° . Efetuaram-se dez leituras às amostras de azeitona em fresco.

2.5.3 Determinação da textura

O parâmetro textura da azeitona foi analisado através de um ensaio de compressão usando um texturómetro (Brookfield – LFRA Texture Analyzer 1500) equipado com uma sonda TA 39 (2 mm diâmetro, 20 mm comprimento e superfície plana). A velocidade da sonda foi de 0,5 mm/s com uma extensão de compressão de 20 mm. A dureza, um dos atributos de textura é a força máxima para comprimir a amostra (Romeo *et al.*, 2009), foi obtida através do software TextureProLite V1.1. Foram realizadas 10 leituras na zona equatorial de meia azeitona em fresco.

2.5.4 Determinação da atividade de água (a_w)

A atividade da água das amostras de salmoura foi medida em duplicado a 25 °C num sensor de humidade de cloreto de lítio (Rotronic DT Hygroskop, DMS-100H).

2.5.5 Determinação da acidez

Preparação do extrato da azeitona

Cinco gramas de azeitona foram maceradas num almofariz com 35 mL de água destilada. Procedeu-se a filtração e recolheu-se o filtrado num balão graduado de 50 mL que se perpez com água destilada. O ensaio foi realizado em duplicado para cada amostra (Romeo *et al.*, 2009).

A acidez livre da salmoura e do extracto de azeitona foi determinada segundo Fernández-Díez *et al.* (1985) com as devidas alterações. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A 10 mL de salmoura adicionou-se 50 mL de água destilada e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N, utilizando como indicador, uma solução de fenolftaleína 1 % (3 gotas). A acidez livre foi expressa em gramas de ácido láctico por 100 mL de salmoura.

Por sua vez, a 5 mL do extrato de azeitona adicionou-se 25 mL de água destilada e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 N, utilizando fenolftaleína (1

%) como indicador. A acidez livre da azeitona foi expressa em gramas de ácido láctico por 100 g de azeitona.

2.5.6 Determinação de compostos fenólicos totais

Extração dos compostos fenólicos da azeitona

A extração de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Sousa *et al.* (2006) com ligeiras alterações. A 5 g de azeitona macerada adicionou-se 15 mL de metanol a 100 % e manteve-se durante 24 horas, sob agitação (Edmund Buhler KL2, 150 rpm) e ao abrigo da luz. Seguidamente, centrifugou-se (Sigma 3K20) a 1600 g, 20 °C durante 15 min e filtrou-se o sobrenadante utilizando um filtro (Macherey-Nagel MN 615 Ø 70 mm). Recolheu-se o filtrado num balão de 25 mL e perpez-se o volume com metanol a 100 %. O ensaio foi realizado em triplicado.

Extração dos compostos fenólicos da salmoura

A extração dos compostos fenólicos da salmoura foi realizada de acordo com o mesmo procedimento utilizado para a azeitona, sem que se aguardasse 24 horas, usando 5 mL de salmoura. O ensaio foi realizado em triplicado.

A concentração de compostos fenólicos totais nas amostras (salmoura e azeitona) foi determinada por espectrofotometria de acordo com Singleton *et al.* (1999) com algumas modificações. A 0,1 mL de extrato de azeitona ou salmoura adicionou-se 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 N), agitou-se e aguardou-se 2 minutos. Seguidamente, adicionou-se 0,4 mL de solução saturada de carbonato de sódio 7,5 % (m/v) e 4 mL de água. Após 1 hora, ao abrigo da luz, fez-se a leitura, em duplicado, da absorvância a 765 nm num espectrofotómetro (Hitachi U-2000). A concentração em compostos fenólicos totais foi calculada com base numa curva de calibração de ácido gálico com as seguintes concentrações (0,015; 0,0325; 0,075; 0,125; 0,25; 0,50 mg/mL) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g de azeitona ou em mg de ácido gálico/100 mL de salmoura.

2.5.7. Determinação de açúcares redutores

Extração dos açúcares redutores da azeitona

Macerou-se 10 g de azeitona em 50 mL de água destilada a 20 °C e agitou-se a 150 rpm durante 30 minutos. Filtrou-se e procedeu-se à determinação de açúcares redutores segundo Miller (1959) referido por Maldonado *et al.* (2008).

A concentração de açúcares redutores nas amostras de azeitona e salmoura foi determinada por espectrofotometria. Num tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS, 98 %) a 1 mL de extrato de azeitona ou 1 mL de diluição adequada de salmoura e agitou-se vigorosamente. Colocou-se o tubo de ensaio em banho de água a 100 °C, durante 5 minutos e posteriormente arrefeceu-se sob água corrente. Adicionou-se 10 mL de água destilada estéril e agitou-se num vórtex. Mediu-se a absorvância a 540 nm num espectrofotómetro (Genesys™ 10 series). A concentração em açúcares redutores foi calculada usando uma curva de calibração de glucose (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 g/L) e os resultados foram expressos em g/kg de azeitona ou g/L de salmoura.

2.5.8 Determinação de cloretos na salmoura

O teor de cloretos na salmoura foi determinado através do método de Mohr (Fernández-Díez *et al.*, 1985). Colocou-se 1 mL de salmoura e 99 mL de água destilada num gobelé. Adicionou-se 4 gotas de uma solução de fenolftaleína e acertou-se o pH a 8,3 com NaOH 0,1 N. Seguidamente, adicionou-se 2 mL da solução de cromato de potássio 5% e titulou-se com AgNO₃ 0,1 N. Os ensaios foram realizados em triplicado e fez-se um ensaio em branco. O teor de cloretos foi expresso em g/100 mL de salmoura.

2.6 Parâmetros microbiológicos

Os parâmetros microbiológicos foram avaliados na polpa da azeitona e na salmoura na fase final de fermentação, com o objetivo de verificar a qualidade e segurança microbiológica das azeitonas de mesa e viabilizar a análise sensorial. Para este efeito, contaram-se os bolores e leveduras, os coliformes totais, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e pesquisaram-se *Salmonella sp.*, e *Listeria monocytogenes*, porém não estão descritos neste relatório por não fazerem parte dos objetivos do presente trabalho.

2.7 Análise sensorial

Após 5 meses de fermentação, as azeitonas submetidas às 5 condições estudadas com diferentes concentrações de sais (cf. 2.1), foram avaliadas em relação aos seguintes atributos sensoriais: aspeto, firmeza, aroma, acidez, amargor, teor de sal, sabor e apreciação global, por um painel constituído por 19 provadores, não treinados, de sexo feminino e masculino e idades compreendidas entre os 20 e 60 anos.

Todas as amostras de azeitona disponibilizadas para análise sensorial foram previamente analisadas microbiologicamente, para avaliar as condições de higiene e segurança alimentar.

Foi facultada a cada provador, uma ficha de registo dos atributos avaliados (Anexo I), tendo sido solicitado que atribuíssem a cada amostra valores compreendidos numa escala de 1 a 7, sendo:

- 1 - Muito mau a 7 - Excelente; para atributos como aroma, sabor, aspeto e apreciação global;
- 1 - Sem a 7 - Muito; para atributos como acidez, amargor, firmeza e teor de sal.

Os resultados da análise sensorial foram analisados graficamente e estatisticamente através do software *IBM SPSS Statistics 21*. Os resultados da análise sensorial foram submetidos a análise de variância Anova (One-way Analysis of Variance) e sempre que se observou efeito significativo ($p < 0,05$) procedeu-se à comparação das médias, pelo teste de Scheffé (Maroco, 2003).

2.8 Composição nutricional

2.8.1 Determinação do resíduo seco e teor de humidade

Secaram-se placas de Petri em estufa (Selecta) a 80 °C durante 10 minutos. Após esse período, retiraram-se e colocaram-se num exsiccador até atingir a temperatura ambiente (± 25 °C). Pesaram-se as placas numa balança analítica (Mettler, AE 200). Seguidamente, colocou-se cerca de 15 g de azeitona previamente triturada na placa e secou-se em estufa (Selecta) à temperatura de 105 °C, até se atingir peso constante, demorando cerca de 24 horas. Transferiu-se a placa para um exsiccador, até arrefecer completamente, sendo de seguida pesada rigorosamente numa balança analítica (Mettler, AE 200). O ensaio foi realizado em triplicado. O teor de resíduo seco foi expresso em percentagem.

O teor de humidade foi determinado por diferença entre 100 % (humidade de fruto fresco) e o resíduo seco obtido.

2.8.2 Determinação do teor em proteína bruta

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2000). Pesaram-se cerca de 5 g de azeitona previamente triturada, numa balança analítica (Mettler, AE 200). Num tubo de digestão, colocou-se a amostra envolvida num papel de filtro sem cinzas (Whatman 40, Ø 7,0 cm), uma pastilha de catalisador de Kjeldahl, 25 mL de ácido sulfúrico 95-97 %, 3 gotas de silicone 2 % (antiespumante) e reguladores de ebulição (pérolas de vidro). O ensaio foi realizado em triplicado. Colocaram-se os tubos no digestor (Gerhardt Kjeldatherm) e aqueceu-se lentamente até aos 100 °C, seguindo-se acréscimos de temperatura de 100 °C, de 30 em 30 minutos, até atingir temperatura máxima de 400 °C. Deixaram-se as amostras a digerir até que as soluções apresentassem um tom verde límpido (aproximadamente 10 horas).

Retiraram-se os tubos do digestor e deixou-se arrefecer até que as soluções atingissem a temperatura ambiente (± 25 °C). Adicionou-se 50 mL de água destilada a cada tubo e deixou-se arrefecer novamente.

Num erlenmeyer adicionaram-se 50 mL de ácido bórico 4 % e 3 gotas de indicador misto (Tashiro). Colocaram-se os tubos de digestão no destilador (Gerhardt, Vapodest 1), adicionaram-se 100 mL de hidróxido de sódio a 40 % e procedeu-se à destilação até se recolher um volume de destilado aproximado de 150 mL. De seguida, titulou-se o destilado com ácido clorídrico 0,1 N. O ensaio foi realizado em triplicado.

O teor de azoto total presente na amostra, expresso em percentagem, foi determinado através da seguinte equação:

$$\text{Azoto total (\%)} = \frac{0,14 \times (V_1 - V_2)}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde,

V_1 – Volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL);

V_2 – Volume de ácido clorídrico gasto no ensaio branco (mL);

m – massa da amostra (g).

O teor em proteína bruta, expresso em percentagem, deve ser calculado, multiplicando o valor de azoto total obtido por um fator de conversão no valor de 6,25 (AOAC, 2000):

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \text{Azoto total (\%)} \times 6,25 \quad (\text{Eq. 2})$$

2.8.3 Determinação do teor em matéria gorda livre

O teor em matéria gorda livre foi determinado através do método de Soxhlet (AOAC, 2000). O resíduo seco obtido previamente (c.f. 2.8.1) foi colocado num cartucho de extração (Schleicher & Schuell) e coberto com pequenos pedaços de algodão. O cartucho foi colocado no extrator ligado a um balão, previamente seco na estufa e pesado com algumas pérolas de vidro (reguladores de ebulição) no seu interior. Adicionou-se ao extrator 150 mL de *n*-hexano e procedeu-se à extração da amostra, sob refluxo, numa manta de aquecimento (Selecta) durante 13 horas.

Evaporou-se o *n*-hexano a 67 °C, num evaporador rotativo (Heidolph, Laborota 4000) e colocou-se o balão numa estufa (Selecta) para secar a 105 °C, durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer o balão num exsiccador até se atingir temperatura ambiente (± 25 °C) e pesou-se numa balança analítica (Mettler, AE 200). O ensaio foi realizado em triplicado. O teor em matéria gorda livre foi expresso em percentagem.

2.8.4 Determinação de fibra bruta

O teor em fibra bruta foi determinado através do método Weende (AOAC, 1975). Pesaram-se 1 a 3 gramas de azeitona seca sem gordura (c.f. 2.8.3) numa balança analítica (Mettler, AE 200). Colocou-se a amostra num balão com 200 mL de ácido sulfúrico 0,26 N e silicone antiespumante. De seguida, levou-se o balão à ebulição numa manta de aquecimento, com condensador, durante 30 minutos. Seguidamente, procedeu-se a filtração e lavagem com água destilada quente de modo a não manifestar reação ácida. Depois, transferiu-se a amostra para um balão com 200 mL de hidróxido de potássio 0,23 N e silicone antiespumante, levando-se novamente à ebulição como descrito anteriormente. Após os 30 minutos de ebulição, filtrou-se e lavou-se a amostra com água destilada quente de modo a não apresentar reação alcalina. De seguida, lavou-se a amostra com 50 mL de acetona e secou-se em estufa (Selecta) à temperatura de 105 °C durante 2 horas. Deixou-se arrefecer o recipiente com a amostra num exsiccador até se atingir temperatura ambiente (± 25 °C) e pesou-se a amostra seca numa balança analítica (Mettler, AE 200). Por último, colocou-se o cadinho na mufla (Tecnilab), a 550 °C durante 24 horas para calcinar a amostra. O ensaio foi realizado em triplicado. O teor de fibra bruta presente na amostra, expresso em percentagem, foi determinado através da seguinte expressão:

$$Fibra\ bruta\ (\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{m_0} \times 100 \quad (Eq. 3)$$

onde,

m_0 – massa inicial da amostra (g);

m_1 – massa da amostra seca (g);

m_2 – massa da amostra calcinada (g).

2.8.5 Determinação do teor em cinza

O teor em cinza foi determinado de acordo com a Norma Portuguesa 518 (1986).

Colocou-se o cadinho na mufla (Tecnilab) à temperatura de 550 °C, durante 1 hora, para calcinar e em seguida colocou-se num exsiccador até atingir temperatura ambiente. Pesou-se numa balança analítica (Mettler, AE 200) e introduziu-se cerca de 15 gramas de azeitona. Colocou-se o cadinho sobre um bico de Bunsen a gás, até a amostra inflamar. Depois, colocou-se o cadinho na mufla (Tecnilab), a 550 °C durante 24 horas, para a combustão total da amostra. Após esse período, retirou-se o cadinho e colocou-se a arrefecer num exsiccador, até se atingir temperatura ambiente. Pesou-se numa balança analítica (Mettler, AE 200) o cadinho com as cinzas. O ensaio foi realizado em triplicado. O teor de cinza foi expresso em percentagem

Após determinação do teor em cinza, colocou-se 6 mL de HCl 6 N sobre as cinzas e procedeu-se à sua filtração com papel de filtro (Whatman 40, Ø 7,0 cm). O filtrado foi colocado num balão de 25 mL e que se fez com água MiliQ para determinação de minerais (López *et al.*, 2008).

2.8.6 Determinação dos hidratos de carbono

O teor em hidratos de carbono, expresso em percentagem, foi calculado por diferença entre 100 por cento e a soma dos valores médios em percentagem dos teores em água, proteína, lípidos, fibra bruta e cinzas.

2.8.7 Determinação dos minerais (Na, K e Ca)

A concentração de sódio, potássio e cálcio nas amostras de azeitona foi determinada através de fotometria de emissão de chama (Panagou *et al.*, 2011). As amostras, previamente preparadas a partir das cinzas (c.f. 2.8.5) e devidamente diluídas, foram atomizadas num fotómetro de chama (Flame photometer - Jenway PFP 7) e as concentrações em minerais foram calculadas com base nas curvas de calibração de

sódio, potássio e cálcio de concentrações 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 5, 2, 1 e 0,8 ppm. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos em mg de mineral por 100 g de azeitona.

2.8.8 Determinação do valor energético

O valor energético da azeitona foi expresso em quilocalorias por 100 g azeitona e calculado após a determinação da proteína bruta, hidratos de carbono e gordura, usando os fatores de Atwater de acordo com a seguinte equação (Ferreira, 1994; Commission Directive 2008/100/EC, 2008):

$$\text{Valor Energético} = 4 \times [\text{Proteína (g)} + \text{Hidratos de Carbono (g)}] + 9 \times \text{Gordura (g)} \text{ (Eq. 4)}$$

Resultados e Discussão



3. Resultados e Discussão

As salmouras preparadas para a fermentação de azeitona verde britada apresentavam valores iniciais de atividade termodinâmica de água (a_w) diferentes consoante a combinação de sais utilizada (Tabela 2.1), obtendo-se o valor mais baixo (0,955) para a salmoura com 8 % NaCl e o valor mais alto (0,969) na salmoura sem NaCl. Apesar deste parâmetro não ser largamente afetado pelos diversos cloretos de sal, diferentes solutos podem ter efeitos adicionais antimicrobianos ou mesmo estimuladores de crescimento que não podem ser explicados pelo efeito redutor sobre a_w , podendo influenciar a estabilidade microbiana e a segurança do produto final (Sperber, 1983; Samapundo *et al.*, 2010; Panagou *et al.*, 2011). A substituição do NaCl pelas misturas de sais conduziu a pequenas alterações na a_w das salmouras, o que leva a crer que não se modifica substancialmente o risco de deterioração da azeitona.

A força iónica total (FI Total) das salmouras preparadas não apresenta valores consideravelmente diferentes (Tabela 2.1), apesar de ser tanto maior a força iónica parcelar de cada catião quanto maior é a sua concentração na solução de salmoura (cf. 2.1)

Devido às características específicas dos cloretos de sais, o pH inicial das salmouras é diferente (Tabela 2.1), variando de 6,24 para a salmoura com os três sais a 6,53 para a salmoura com 8 % NaCl. Aparentemente, a presença de cloreto de cálcio reduz o pH inicial da salmoura, o que pode reduzir o risco inicial de crescimento de microrganismos deterioradores ou patogénicos no início da fermentação (Bautista-Gallego *et al.*, 2011).

A evolução do processo fermentativo da azeitona verde britada foi seguida por análise na salmoura dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez livre, açúcares redutores e salinidade, assumindo que a composição da fase aquosa da azeitona era idêntica à da salmoura de fermentação.

Após a fermentação, caracterizou-se a azeitona de mesa obtida nos vários ensaios com diferentes combinações de sais por análise dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez livre, açúcares redutores e compostos fenólicos totais, parâmetros morfológicos, cor e textura, atributos sensoriais e composição nutricional.

A fermentação deu-se por finalizada aos 162 dias, altura em que a azeitona foi considerada “pronta a comer”, assim designada por azeitona de mesa, pelo painel de provadores responsável pela análise sensorial.

3.1 Evolução da fermentação

3.1.1 pH e acidez livre na salmoura

Durante a fermentação da azeitona com diferentes sais a alteração do pH e da acidez livre das salmouras foi monitorizada e está representada na Figura 3.1.

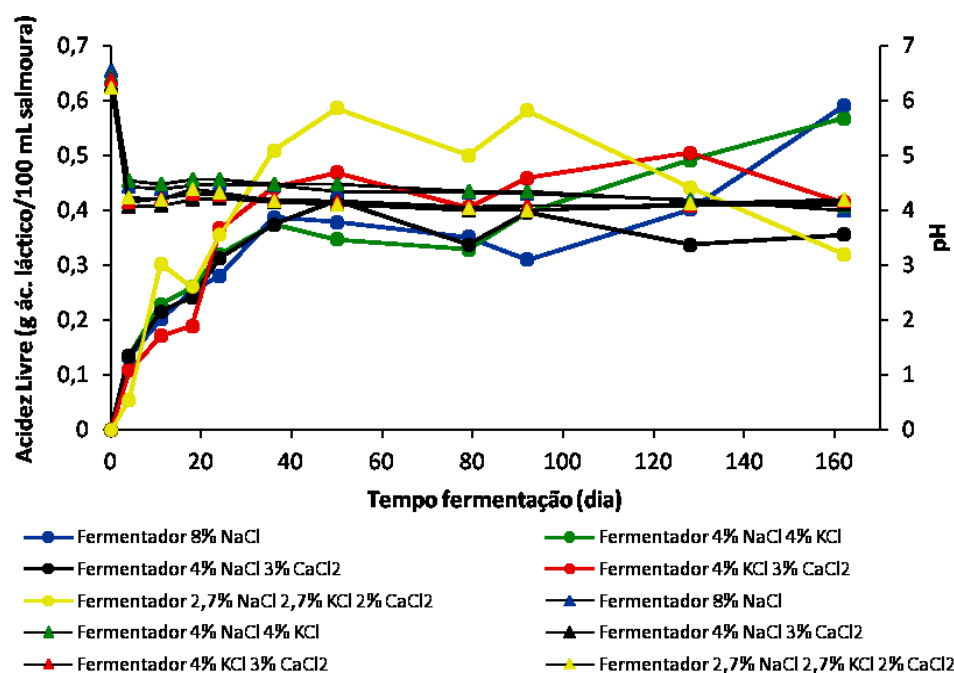


Figura 3.1 Evolução do pH (▲) e da acidez livre (●) das salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação.

Os valores de pH diminuíram nos primeiros 4 dias, tendo depois estabilizado ao longo do período fermentativo (162 dias), atingindo valores de 4,01 a 4,2. (Figura 3.1). A diminuição de pH está associada a um aumento da acidez livre, devido à difusão de ácidos orgânicos da polpa da azeitona para a salmoura, até que se atinge um equilíbrio osmótico (Romeo *et al.*, 2009). Além disso, durante a fermentação também ocorre produção de ácidos que contribuem para o abaixamento do pH e o aumento da acidez das salmouras.

Com efeito, na Figura 3.1, pode observar-se que a acidez aumentou de forma progressiva até ao 50º dia em todas as salmouras estudadas, sendo que nos primeiros 20 dias este aumento é menos acentuado na salmoura que não contém NaCl, tendo-se mantido depois praticamente inalterada até ao final da fermentação, atingindo-se valores que variam entre 0,32 e 0,59 g ácido láctico/100 mL de salmoura, para as salmouras

contendo os três sais (2,67 % NaCl e 2,67 % KCl e 2% CaCl₂) e 8 % NaCl, respectivamente.

A evolução dos valores de pH e acidez livre foi semelhante aos resultados obtidos em estudos sobre o processamento de azeitona verde britada da cultivar Maçanilha (Rodrigues, 2011; Alves, 2010 e Bautista–Gallego *et al.*, 2010).

Os substitutos de cloreto de sódio utilizados na formulação das salmouras não influenciaram consideravelmente os valores finais de pH e acidez livre da salmoura, os quais se encontram em conformidade com os limites estabelecidos pelo “Trade Standard Applying to Table Olives” (COI, 2004) que define um valor de pH inferior a 4,3 e um valor de acidez mínimo desejável de 0,3 %, expresso em ácido láctico.

3.1.2 Açúcares redutores na salmoura

A evolução dos açúcares redutores das salmouras ao longo da fermentação da azeitona está representada na Figura 3.2. Conforme se pode observar, nos primeiros 4 dias de fermentação houve um aumento na concentração de açúcares redutores na salmoura, em todos os ensaios realizados, sendo contudo menos acentuado com 4 % KCl e 3 % CaCl₂, tendo depois sofrido oscilações que, na generalidade, denotam uma tendência decrescente. No final do período de fermentação, atingiram-se concentrações de açúcares redutores em g/L de salmoura de 3,38 com 8 % NaCl, 2,07 com 4 % NaCl e 4 % KCl, 3,28 com 4 % NaCl e 3 % CaCl₂, 2,37 com 4 % KCl e 3 % CaCl₂ e 2,22 com os três sais. O teor de açúcares redutores na salmoura com 4 % de NaCl e KCl é significativamente menor que o valor observado para as outras salmouras sem KCl. Estes valores parecem indicar que a presença de cloreto de potássio na salmoura afeta a difusão dos açúcares redutores da azeitona para a salmoura e a sua solubilização ou estimula a fermentação e o seu consumo pelos microrganismos, conforme foi sugerido por outros autores (Bautista–Gallego *et al.*, 2011). As concentrações de açúcares redutores de 3,38 e 3,28 g/L salmoura encontram-se acima do valor (2,5 g/L salmoura) referido por Rodrigues (2011) na fermentação de azeitonas da cultivar Maçanilha obtidas segundo o mesmo método de fermentação em salmoura com 8 % NaCl, contudo as restantes concentrações são semelhantes, o que leva a crer que a evolução da fermentação decorreu de forma similar nestes ensaios.

A presença de açúcares redutores no final do processamento de azeitonas pode permitir a continuidade da fermentação durante o período de armazenamento (Arroyo-Lopez *et al.*, 2009). A atividade microbiana após embalamento do produto, pode provocar a turvação das salmouras, produção de aromas indesejáveis, produção de gás que dilata as embalagens plásticas ou derramamento de líquido, em embalagens de vidro e alterações na textura das azeitonas de mesa (Arroyo-López *et al.*, 2008).

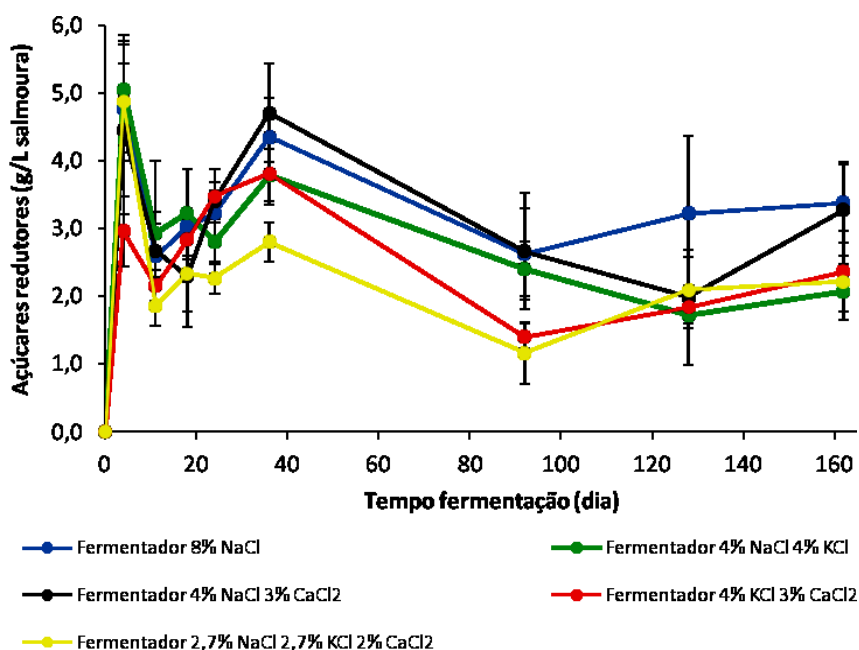


Figura 3.2 Evolução dos açúcares redutores das salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação.

3.1.3 Salinidade na salmoura

A salinidade das salmouras dos diversos sais de cloro foi avaliada pela determinação do teor em cloretos. Ao longo do processo de fermentação da azeitona verificou-se uma redução na concentração dos íons cloreto nas salmouras em estudo, conforme se pode observar na Figura 3.3. A difusão dos sais de cloro da salmoura para a polpa da azeitona parece ocorrer a uma taxa mais elevada na fase inicial da fermentação e estar associada a uma lixiviação mais acentuada dos açúcares redutores nesta fase. No final da fermentação, obtiveram-se concentrações sensivelmente iguais, que variavam entre 2,45 % e 2,89 % para as diferentes salmouras utilizadas (4 % NaCl e 3 % CaCl₂, e, 4 % KCl e 3 % CaCl₂, respetivamente). Romeo *et al.* (2012) referem uma

concentração final de cloreto de sódio de 7,57 % em azeitona britada produzida em salmoura com 10 a 12 % de cloreto de sódio, que comparativamente com o valor obtido neste trabalho de 4,73 % (a que corresponde 2,87 % de ião cloreto) é consideravelmente maior.

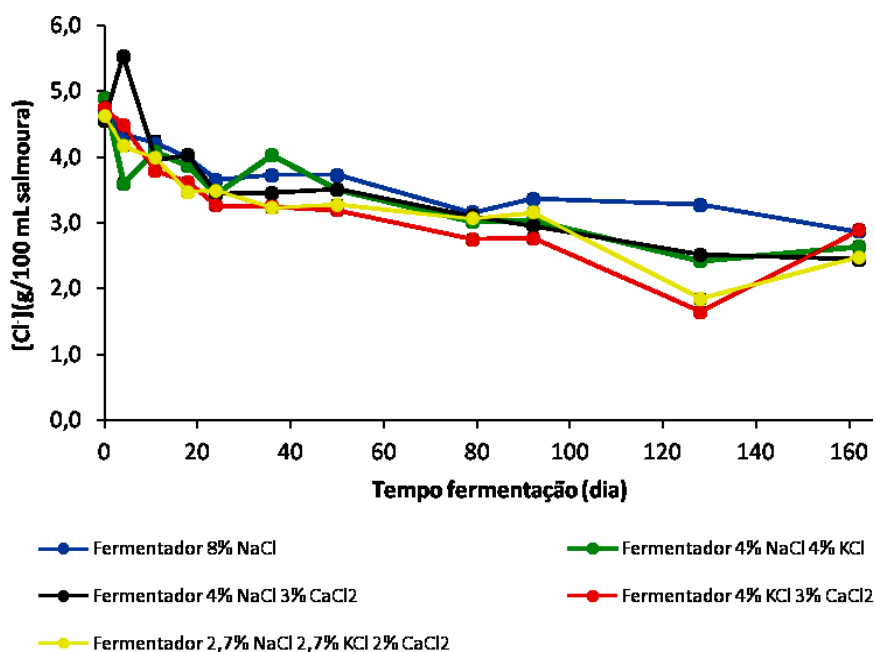


Figura 3.3 Evolução da concentração dos íons cloreto nas salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes ao longo do tempo de fermentação da azeitona verde britada.

3.1.4 Características da salmoura e da azeitona no final da fermentação

No final da fermentação, a atividade termodinâmica de água das salmouras é maior que o valor inicial, devido à absorção dos diversos sais pela polpa da azeitona, diminuindo a sua concentração em solução (0,960 com 8 % NaCl, 0,961 com 4 % NaCl e 4 % KCl ou 4 % KCl e 3 % CaCl₂, 0,962 com os três sais e 0,963 com 4 % NaCl e 4 % CaCl₂. Porém, as diferenças entre a_w observadas no final da fermentação para as várias combinações de sais eram muito pequenas (da ordem do erro), além disso, o aumento de a_w não parece estar diretamente relacionado com as concentrações de sais utilizadas. O sal é utilizado no processamento de azeitona de mesa para conferir sabor, mas também como agente de prevenção do crescimento de microrganismos deterioradores (Fernández *et al.*, 1997), podendo obter-se um valor pré-determinado de atividade de água não apenas com salmouras de NaCl mas também com salmouras

preparadas com diversas combinações de sais, conforme foi igualmente referido por outros autores (Bautista-Gallego *et al.*, 2010).

Os valores de pH da azeitona de mesa fermentada nas diversas combinações (Figura 3.4) não diferem consideravelmente, sendo contudo significativamente maiores que os observados nas respectivas salmouras, as quais apresentavam valores entre 4,01 com 8 % NaCl e 4,2 com os três sais, dentro dos valores exigidos pelo “Trade Standard Applying to Table Olives” (COI, 2004). Esta diferença pode estar associada à técnica de determinação do pH. Supostamente, o pH da salmoura deveria ser igual à da solução aquosa da polpa da azeitona, após equilíbrio e no final da fermentação. Porém, as amostras de azeitona utilizadas na medição do pH foram previamente trituradas, o que poderá ter conduzido ao rebenamento de tecidos e mistura dos diferentes componentes presentes na azeitona, traduzindo-se no aumento do pH.

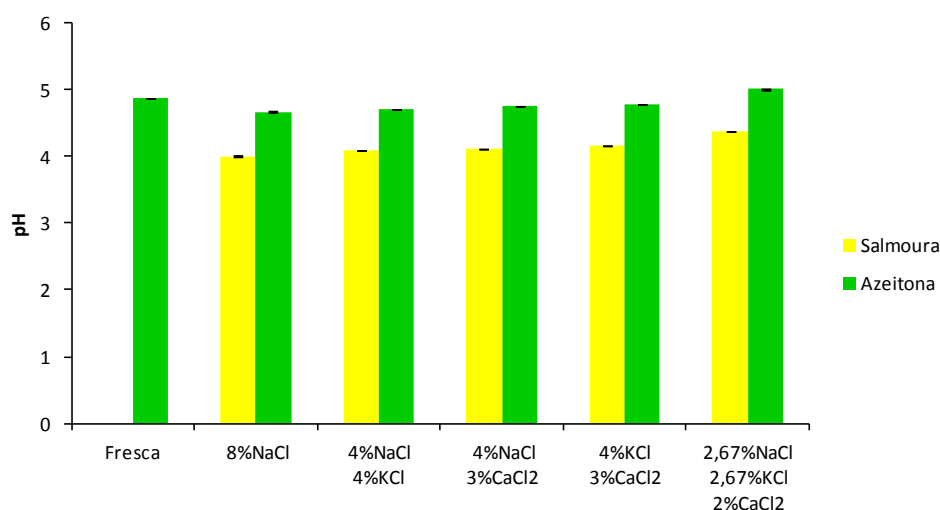


Figura 3.4 pH da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.

A britagem da azeitona favorece as trocas osmóticas entre a polpa e a salmoura envolvente (Arroyo-López *et al.*, 2008b). A taxa de difusão dos solutos, bem como a difusão de sais da salmoura para o interior do fruto, dá-se mais rapidamente devido à exposição dos tecidos internos do fruto provocada pela britagem (Arroyo-López *et al.*, 2007).

De acordo com a figura seguinte (Figura 3.5), verificou-se que a azeitona britada fresca apresentava um valor de acidez de 0,74 g ácido láctico / 100 g de azeitona, devido à presença inicial de ácidos orgânicos. Após fermentação em salmouras de 8 % NaCl e

de 4 % NaCl e 4 % KCl, a acidez livre diminuiu para 0,30 g ácido láctico / 100 g de azeitona. A fermentação realizada numa combinação dos três sais também conduziu à diminuição da acidez livre para um valor de 0,60 g ácido láctico / 100 g de azeitona. Esta redução da acidez livre no final do processo de fermentação, deve-se certamente à difusão dos ácidos orgânicos da azeitona para a salmoura. Os resultados apresentados na figura mostram também que azeitona fermentada em salmouras contendo sais de cloreto de cálcio sofrem uma diminuição menor da acidez livre, o que sugere que a presença deste sal na salmoura inibe ou retarda a difusão dos ácidos orgânicos.

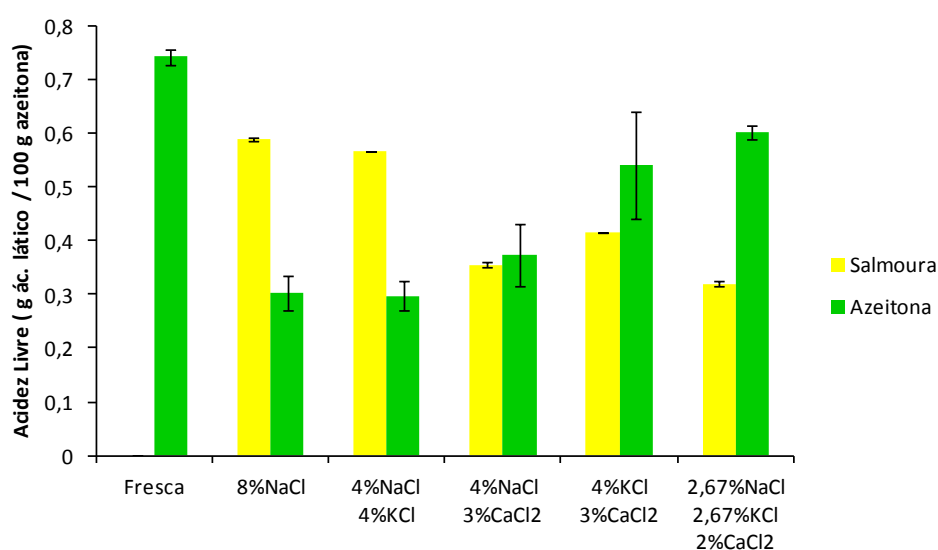


Figura 3.5 Acidez livre da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.

No que diz respeito à concentração de açúcares redutores na azeitona (Figura 3.6) verificou-se uma redução significativa destes compostos com a fermentação, resultante da difusão dos açúcares da polpa da azeitona para o líquido fermentativo e o seu consumo pelos microrganismos presentes.

O teor de açúcares redutores na azeitona de mesa fermentada nas diversas combinações de sais variou entre 2,08 g/kg azeitona na salmoura com os três sais e 3,89 g/kg azeitona na salmoura com cloretos de potássio e de cálcio (Figura 3.6). Estes valores são significativamente diferentes entre si, o que indica que a difusão dos açúcares para a salmoura é afetada pela substituição do sal de cloreto de sódio, verificando-se uma retenção maior destes compostos na azeitona fermentada em salmoura de 4 % KCl e 3 % CaCl₂. Os teores de açúcar nas salmouras são sensivelmente iguais aos respetivos valores encontrados na azeitona de mesa, indicando

um equilíbrio na concentração destes compostos entre a fração aquosa da polpa da azeitona e a salmoura.

Segundo Morales-Sillero *et al.* (2008) num trabalho realizado em azeitonas da cultivar Maçanilha produzidas pelo método Espanhol com uma solução de salmoura de 10 % NaCl, a concentração de açúcares redutores na azeitona após fermentação variou entre 3,5 a 4,4 %. Contudo, as concentrações de açúcares redutores obtidas das azeitonas com diferentes proporções de sais estão acima das da literatura.

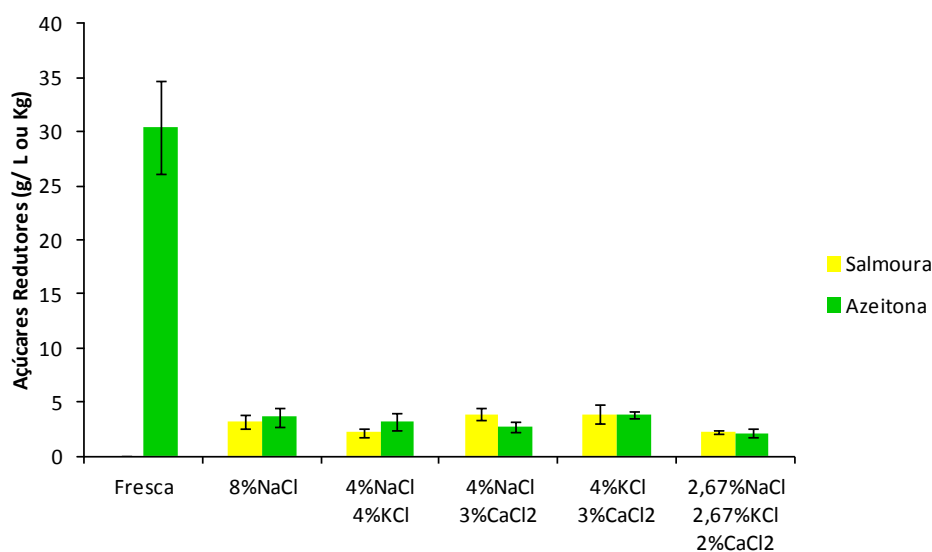


Figura 3.6. Concentração de açúcares redutores da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.

A concentração de compostos fenólicos nas salmouras e azeitonas produzidas nos processos fermentativos levados a cabo com diferentes concentrações de sais, está representada na Figura 3.7.

A azeitona fresca apresenta um teor em compostos fenólicos totais significativamente maior que os valores observados nas azeitonas após fermentação, devido à difusão parcial dos fenólicos da polpa da azeitona para o meio fermentativo.

Após a fermentação, o teor em compostos fenólicos totais nas azeitonas varia entre 842,3 e 1379,7 mg ácido gálico/kg de azeitona, para as fermentações em 4 % de NaCl e KCl e em 4 % NaCl e 3 % CaCl₂, respetivamente (Figura 3.7), o que indica que a presença de cloreto de potássio na preparação inicial de salmoura facilita a perda de compostos fenólicos totais da azeitona, e, a substituição parcial do sódio por cálcio

conduz a uma maior retenção. Pela mesma razão, salmouras preparadas sem cloreto de cálcio (8 % NaCl, 4 % NaCl e 4 % KCl) apresentam, após fermentação, teores em fenólicos totais (1784,1 e 1573,8 mg ácido gálico/L de salmoura, respetivamente) significativamente maiores que as outras salmouras. Além disso, parece haver um equilíbrio entre o teor de fenólicos totais na azeitona e respetiva salmoura nos ensaios realizados na presença de cloreto de cálcio, ao passo que em salmouras preparadas com 8 % NaCl e 4 % NaCl e KCl há diferenças significativas. Estas concentrações de compostos fenólicos totais na salmoura não são consideravelmente diferentes do valor referido por Romeo *et al.* (2009) em salmoura com 8 % NaCl de azeitonas de mesa verdes produzidas por fermentação natural durante seis meses, 1438,6 mg ácido gálico/L salmoura. De acordo com os mesmos autores, a azeitona verde após fermentação natural têm uma concentração em compostos fenólicos de 2719,5 mg ácido gálico/kg de azeitona, superior aos valores observados neste trabalho.

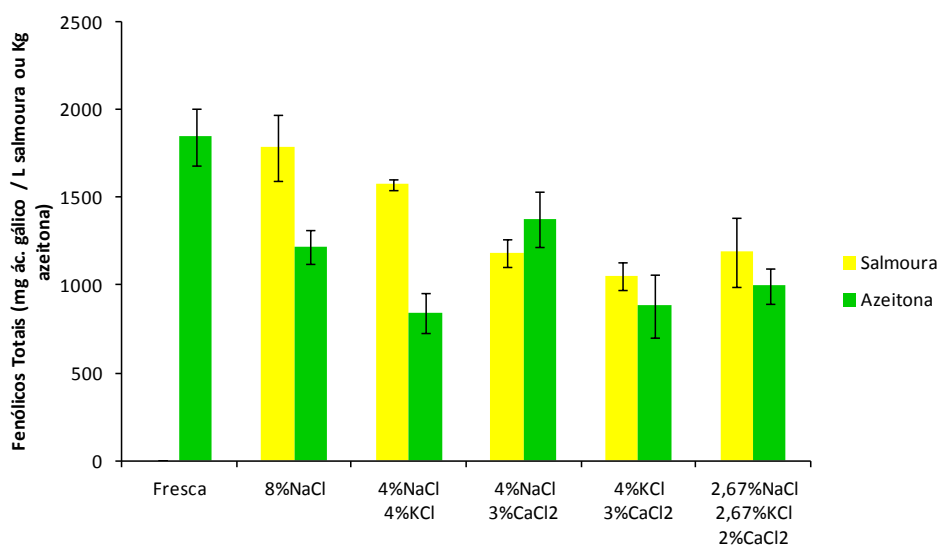


Figura 3.7 Concentração de compostos fenólicos totais da azeitona de mesa e respetiva salmoura com concentrações iniciais de sais diferentes.

3.2 Caracterização da azeitona de mesa verde britada

3.2.1 Morfologia da azeitona de mesa

A caracterização morfológica da azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha foi realizada através da determinação de várias propriedades físicas, a massa do fruto e a massa do caroço; a fração edível; as dimensões do fruto (diâmetro e comprimento) e o diâmetro do caroço. Os resultados obtidos foram reunidos nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 Parâmetros biométricos da azeitona britada Maçanilha (média ± desvio padrão).

Massa do fruto (g)	Massa do caroço (g)	Fração edível (%)
4,28 ± 1,11	1,08 ± 0,28	74,19 ± 4,83

Tabela 3.2 Dimensões da azeitona (média ± desvio padrão).

Diâmetro (cm)	Comprimento (cm)	Diâmetro do caroço (cm)
1,51 ± 0,50	1,77 ± 0,42	1,34 ± 0,31

A azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha tem uma massa semelhante ao valor referido por Morales-Sillero *et al.* (2008) num estudo realizado com a mesma cultivar de azeitona (4,25 g). A fração em polpa é um parâmetro de extrema importância na produção de azeitona de mesa. Com efeito, a valorização da azeitona depende da fração edível, sendo desejável que a azeitona tenha muita polpa e pouco caroço (Sakouhi *et al.*, 2008). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3.1) a azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha têm 3 vezes mais polpa (~74 %) que caroço (~26 %), apresentando valores dentro dos limites referidos por Bianchi (2003) de 70-80 % para a fração em polpa e ≤ 22 % para a fração em caroço.

No que diz respeito às dimensões da azeitona (Tabela 3.2), os valores revelam que esta cultivar tem uma forma oval, com uma relação comprimento:diâmetro de 1,2 cm. O comprimento da azeitona é ligeiramente menor que o valor encontrado por Aponte *et al.*, (2010) para a mesma cultivar azeitona (1,94 cm) e o diâmetro do caroço é semelhante ao referido por Morales-Sillero *et al.* (2008) de 1,34 cm.

3.2.2 Caracterização microbiológica

O estudo da avaliação da qualidade microbiológica da azeitona de mesa produzida na presença das diferentes misturas de sais revelou que em nenhum dos casos se detetaram bactérias da família *Enterobacteriaceae* (coliformes e *Escherichia coli*) nem as bactérias patogénicas *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. As contagens de leveduras em todos os fermentadores foram inferiores a 10^6 ufc/g, valor que está abaixo do limite estabelecido pelo “Trade Standard Applying to Table olives” (COI, 2004).

3.2.3 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial realizada à azeitona fermentada em salmouras com diferentes combinações de sais estão representados na Figura 3.8 e na Tabela 3.3.

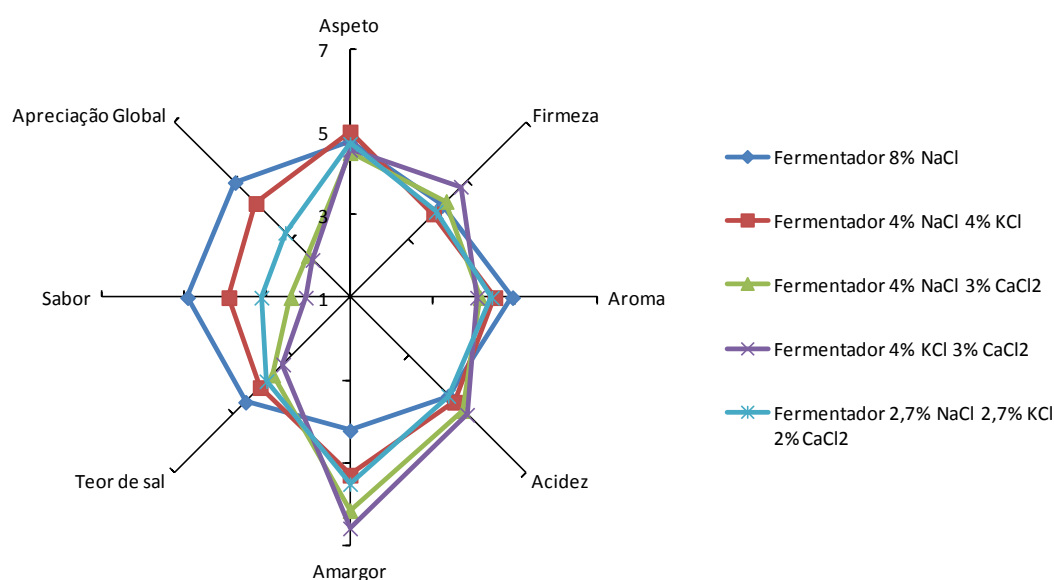


Figura 3.8 Perfil sensorial da azeitona de mesa fermentada em salmouras com diferentes concentrações iniciais de sais.

Os provadores consideraram que a azeitona de mesa fermentada em salmoura com diferentes concentrações iniciais de sais apresentava o mesmo aspeto (razoável), aroma (razoável), firmeza (ótima) e acidez (ótima) (Figura 3.8 e Tabela 3.3).

Quanto ao teor de sal da azeitona, este valor era ótimo em todos os ensaios realizados, com exceção da azeitona produzida com 4 % KCl 3 % CaCl₂, que os provadores classificaram de menos salgada (Figura 3.8 e Tabela 3.3).

A utilização de KCl e CaCl₂ na preparação das salmouras de fermentação têm um efeito sobre a percepção do amargor na azeitona. A salmoura com 8 % NaCl conferiu um amargor ótimo e, de acordo com a classificação atribuída pelos provadores, esta azeitona destaca-se significativamente das outras. A substituição parcial de NaCl por KCl ou KCl e CaCl₂ produziu azeitona com amargor ligeiramente mais intenso, mas aceitável na opinião dos provadores. Quando a azeitona foi fermentada em salmoura sem NaCl, o amargor atingiu uma classificação muito elevada. Estes resultados sugerem que a ausência de cloreto de sódio nas salmouras é desaconselhada pelos provadores,

podendo contudo ser parcialmente substituído por cloreto de potássio sem que isso afete a aceitabilidade do produto final (Figura 3.8 e Tabela 3.3).

Azeitonas fermentadas em 8 % NaCl ou 4 % NaCl e 4 % KCl tiveram melhor aceitabilidade por parte dos provadores, pois apresentavam sabor e apreciação global razoável e significativamente melhor que a azeitona fermentada em salmouras com CaCl₂, nomeadamente em salmoura sem NaCl (4 % KCl e 3 % CaCl₂) cuja classificação estava abaixo do razoável (Figura 3.8 e Tabela 3.3). De acordo com estes atributos, a análise sensorial sugere que a substituição parcial ou total do cloreto de sódio por cloreto de cálcio ou cloretos de potássio e de cálcio é desaconselhada, podendo, contudo, utilizar-se preparações de salmouras de concentração equivalente de cloretos de sódio e potássio.

Por conseguinte, pode-se concluir que as azeitonas produzidas com 8 % NaCl ou 4 % NaCl e 4 % KCl apresentaram as mesmas características organoléticas, sendo diferentes das azeitonas fermentadas em preparações sem NaCl ou onde o cloreto de sódio foi substituído parcialmente por CaCl₂ ou totalmente por KCl e CaCl₂. Estes resultados são comparáveis com os de outros autores (Panagou *et al.*, 2011), que estudaram o efeito da substituição de cloreto de sódio por combinações de sais de cloretos de potássio e de cálcio em preparações de salmouras na fermentação de azeitonas pretas naturais da cultivar “Conservolea”.

Tabela 3.3 Resultados da análise sensorial a azeitona de mesa fermentada em salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes.

Amostra	Apreciação Global	Aspetto	Sabor	Teor Sal	Acidez	Amargor	Aroma	Firmeza
8% NaCl	4,93 ± 1,21 ^a	4,79 ± 1,18 ^a	4,93 ± 0,99 ^a	4,57 ± 0,94 ^a	4,36 ± 0,74 ^a	4,21 ± 0,58 ^a	4,93 ± 0,92 ^a	4,14 ± 0,86 ^a
4%NaCl 4%KCl	4,21 ± 1,31 ^{a,b}	5,00 ± 1,17 ^a	3,93 ± 1,49 ^{a,b}	4,07 ± 0,92 ^a	4,57 ± 1,02 ^a	5,29 ± 0,83 ^b	4,50 ± 1,09 ^a	3,86 ± 1,03 ^a
4%NaCl 3%CaCl ₂	2,43 ± 1,09 ^c	4,50 ± 1,29 ^a	2,43 ± 1,02 ^c	3,64 ± 1,15 ^a	4,86 ± 1,41 ^a	6,14 ± 0,86 ^{b,c}	4,14 ± 0,66 ^a	4,29 ± 0,83 ^a
4%KCl 3%CaCl ₂	2,29 ± 1,38 ^c	4,57 ± 1,45 ^a	2,07 ± 1,07 ^c	3,29 ± 0,99 ^b	5,00 ± 1,36 ^a	6,57 ± 0,66 ^c	4,07 ± 1,07 ^a	4,79 ± 1,19 ^a
2,7%NaCl 2,7%KCl 2%CaCl ₂	3,21 ± 1,37 ^{b,c}	4,71 ± 1,14 ^a	3,14 ± 1,29 ^{b,c}	3,86 ± 0,95 ^a	4,36 ± 1,28 ^a	5,50 ± 1,02 ^b	4,43 ± 1,28 ^a	3,93 ± 1,38 ^a

Média ± SD, n = 15.

Para cada atributo, os valores médios seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si para p ≤ 0,05.

3.2.4 Caracterização física

A caracterização física da azeitona foi realizada através da medição da dureza e da cor (parâmetros da escala *Hunter Lab*) da azeitona inteira, da azeitona britada e da azeitona de mesa obtida por fermentação em salmouras com concentrações iniciais de sais diferentes (Tabela 3.4).

A dureza ou firmeza é uma das características organolépticas mais importantes na azeitona de mesa. De fato, azeitona de mesa com uma dureza inapropriada, mole, pode ser rejeitada pelo consumidor por não corresponder à sua expectativa. Com base nos resultados obtidos através da análise instrumental (Tabela 3.4) pode-se constatar que as azeitonas fermentadas em salmoura com diferentes combinações de sais não apresentaram valores de dureza significativamente diferentes entre si, conclusão semelhante à encontrada pela análise sensorial, o que revela que os resultados instrumentais reproduzem as observações sensoriais.

De acordo com os resultados (Tabela 3.4), a dureza da azeitona alterou-se consideravelmente com a britagem, devido à rutura parcial da pele e da polpa da azeitona e o amolecimento da polpa por efeito do impacto, observando-se uma diferença significativa na dureza entre a azeitona fresca inteira e a azeitona britada fresca e fermentada em salmoura com a combinação de cloretos de sódio e de potássio. A fermentação em salmoura durante 162 dias não foi determinante na alteração da dureza. Os valores variaram entre 344,5 g (4 % NaCl e 4 % KCl) e 598 g (4 % KCl e 3 % CaCl₂). A azeitona de mesa fermentada na salmoura com a combinação de cloretos de potássio e de cálcio é consideravelmente mais dura que qualquer das outras, o que sugere que a combinação destes sais, nomeadamente a presença de cálcio possa prevenir o amolecimento das azeitonas (Arroyo-López *et al.*, 2008a).

Tabela 3.4 Análises físicas realizadas às azeitonas inteiras e britadas antes de sofrer processo tecnológico e às azeitona de mesa fermentadas com diferentes concentrações de sais, média e desvio padrão.

	Dureza (g)	Cor		
		L	a	b
Fresca Inteira	634,3 ± 166,8 ^a	57,03 ± 4,105 ^a	-9,30 ± 2,12 ^a	19,31 ± 2,413 ^{a,b,c,d}
Fresca Britada	392,9 ± 119,4 ^{a,b}	54,32 ± 2,698 ^{a,b,c}	-7,32 ± 1,39 ^b	17,98 ± 3,611 ^{a,b}
8% NaCl	368,8 ± 80,6 ^{a,b}	53,31 ± 3,901 ^{a, b, c}	2,66 ± 1,80 ^c	20,92 ± 1,831 ^{b,c,d}
4% NaCl 4% KCl	344,5 ± 95,3 ^b	55,16 ± 2,163 ^{a, b}	1,54 ± 0,69 ^c	22,25 ± 1,101 ^d
4% NaCl 3% CaCl₂	402,4 ± 120 ^{a,b}	50,15 ± 5,809 ^c	2,67 ± 1,50 ^c	17,80 ± 4,005 ^a
4% KCl 3% CaCl₂	598 ± 377 ^{a,b}	54,17 ± 4,081 ^{a,b,c}	2,26 ± 1,07 ^c	21,38 ± 2,623 ^{c,d}
2,7% NaCl 2,7% KCl 2% CaCl₂	422,3 ± 65,1 ^{a,b}	51,21 ± 2,746 ^{b,c}	2,50 ± 0,51 ^c	19,18 ± 1,26 ^{a,b,c}

Média ± SD, n = 10 para dureza; n = 20 para os parâmetros da cor.

Para cada atributo, os valores médios seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si para $p \leq 0,05$.

No que diz respeito à cor da superfície da azeitona, nomeadamente ao parâmetro *L*, a azeitona fresca inteira apresentou uma luminosidade ligeiramente maior que a azeitona britada fresca e fermentada, o que sugere que a fragmentação dos tecidos e a perda de fluido celular, por efeito da britagem, possa conduzir ao escurecimento da azeitona (Tabela 3.4). A luminosidade da azeitona fermentada em salmoura com 4% NaCl e 3 % CaCl₂ apresentou o menor valor (50,15 ± 5,809) sendo significativamente diferente da azeitona fresca inteira e da azeitona fermentada em 4 % NaCl e 4 % KCl. A presença de cloreto de cálcio poderá ser responsável por esta diferença.

Em relação ao parâmetro *a* (que dá indicação da coloração verde-vermelha) observou-se que a azeitona fresca inteira é significativamente mais verde que a azeitona fresca britada e por sua vez estas são significativamente diferentes da azeitona fermentada em qualquer combinação de sais de salmoura (Tabela 3.4). Estas observações estão relacionadas com a perda da cor verde, devido à degradação da clorofila e com o aparecimento de pigmentos de cor castanha durante o processo de fermentação.

Relativamente ao parâmetro *b* (que toma valores de -100 a +100, para os tons de azul a amarelo), verificaram-se diferenças significativas entre as azeitonas processadas com 4 % NaCl e 4 % KCl e com 4 % NaCl e 3 % CaCl₂, sendo as fermentadas com

cloreto de potássio as mais amareladas e as obtidas com cloreto de cálcio as menos amareladas.

Em geral, a cor parece revelar-se diferente consoante a azeitona é fresca inteira, fresca britada ou fermentada. Esta diferença é importante quando comparamos azeitona de mesa fermentada em salmouras com diferentes combinações de sais e de acordo com os resultados das análises sensorial e instrumental, a azeitona fermentada em salmoura com cloreto de cálcio é a menos amarelada e menos verde, com uma menor intensidade luminosa e a menos apreciada pelos provadores.

3.2.5 Composição nutricional

De modo a caracterizar a composição nutricional das amostras que apresentaram melhor apreciação e maior aceitabilidade pelo painel de provadores, nomeadamente a azeitona fermentada em 8 % NaCl e em 4 % NaCl e 4 % KCl, foi determinado o teor de humidade, proteína bruta, gordura, hidratos de carbono, fibra, cinzas, valor calórico e minerais. Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 3.5, onde se pode observar que, na generalidade, a composição nutricional da azeitona de mesa obtida por fermentação em salmouras de diferentes concentrações de sais é semelhante.

Tabela 3.5 Composição nutricional de azeitona de mesa fermentada em salmouras de 8 % NaCl e de 4 % NaCl e 4 % KCl, expressa em percentagem (média \pm desvio padrão).

Composição Nutricional (em 100 g azeitona)		
	8 % NaCl	4 % NaCl e 4% KCl
Humidade (g)	58,63 \pm 0,36	62,26 \pm 1,92
Proteína (g)	1,17 \pm 0,01	1,22 \pm 0,01
Gordura (g)	26,96 \pm 0,32	25,80 \pm 1,56
Hidratos de carbono (g)	7,79 \pm 0,86	5,46 \pm 0,52
Fibra (g)	1,87 \pm 0,14	1,55 \pm 0,09
Cinzas (g)	3,58 \pm 0,24	3,72 \pm 0,15
Energia (kcal)	278,52 \pm 0,87	258,91 \pm 15,97
Minerais (mg)		
Na	2513,4 \pm 22,2	1975,1 \pm 255,3
K	108,5 \pm 0,3	848,3 \pm 10,1
Ca	88,8 \pm 5,0	89,5 \pm 6,2

A água é o componente maioritário na composição da azeitona de mesa, tendo-se observado um valor superior nos ensaios de fermentação realizados com a combinação de sais de sódio e potássio. Estes valores são inferiores ao apontado por Sousa *et al.* (2011) que obteve valores médios de 72,5 % em azeitonas “*Alcaparras*”, provavelmente devido ao diferente processamento desta azeitona.

No que respeita ao teor em proteína bruta, Kailis & Harris (2007) obtiveram 1,2 % para azeitona de mesa da cultivar Maçanilha produzida por fermentação natural, o que se assemelha ao valor observado neste trabalho (Tabela 3.5).

A gordura é o segundo componente mais abundante na azeitona. Os valores obtidos encontram-se ligeiramente acima do teor de gordura da azeitona de mesa de cultivar Maçanilha (18,4 % gordura) citado por Kailis & Harris (2007). Esta diferença pode estar relacionada com as condições edafo-climáticas ou com o método de processamento utilizado (Sousa *et al.*, 2011).

No que diz respeito ao teor em hidratos de carbono, obtiveram-se valores que se encontram em conformidade com o reportado por Kailis & Harris (2007) de 7 %, obtido em azeitonas de mesa da mesma cultivar.

Os valores obtidos para o teor em fibra são ligeiramente inferiores ao referido por López-López *et al.* (2007) para a mesma cultivar de azeitona (2,94 %), o que sugere que este constituinte também é influenciado pelas condições edafo-climáticas a que a azeitona foi sujeita durante o seu desenvolvimento.

Os teores em cinza observados na azeitona, em ambas as salmouras, não diferem do valor 3,5 % referido por Kailis & Harris (2007). O teor em cinzas está relacionado com a mineralização da azeitona e com a concentração em sais na salmoura que durante a fermentação migram para a azeitona. Deste modo, é de esperar que o valor deste constituinte aumente durante a fermentação e que a presença de teores reduzidos de cinzas indique um baixo teor em sal (Nogueira, 2012).

Finalmente, a azeitona de maior valor calórico, foi fermentada em salmoura com 8 % NaCl, porém a diferença entre os teores calóricos não é considerável.

A composição mineral da azeitona fresca britada e após fermentação em diversas concentrações iniciais de sais, está representada na Figura 3.9.

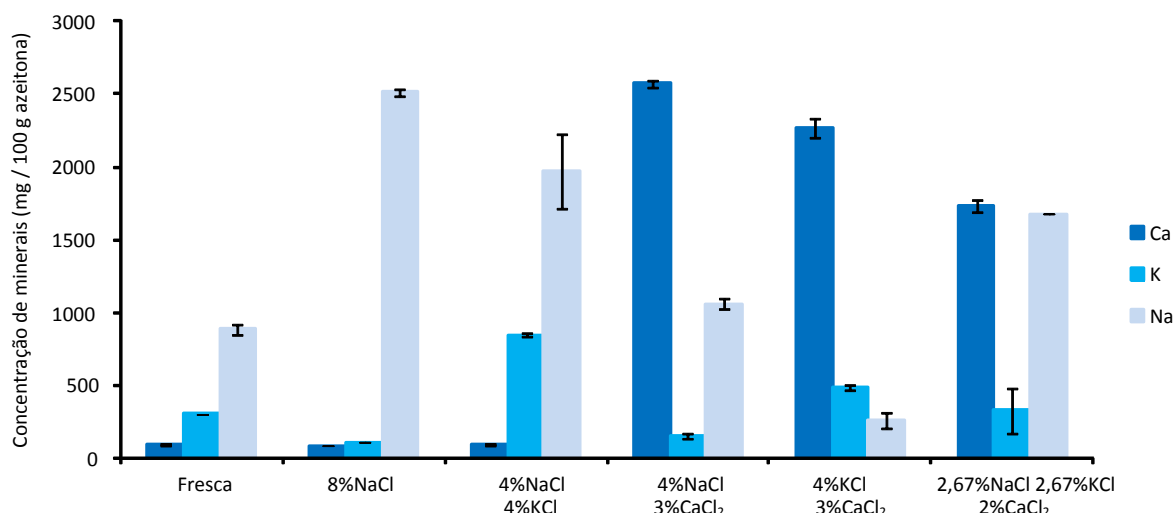


Figura 3.9 Concentração de minerais (mg/100 g azeitona) em cálcio, potássio e sódio em azeitonas verdes britadas de cultivar Maçanilha frescas e após fermentação.

A utilização de misturas de sais de cloreto na salmoura afetou a concentração da composição mineral da azeitona em estudo (Figura 3.9). A concentração dos minerais Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} na azeitona é tanto maior quanto maior é a concentração do respetivo catião na salmoura de fermentação e por conseguinte, quanto maior é a força iónica do catião em solução. Além disso, a concentração em NaCl equivalente na azeitona aumenta com a força iónica total da salmoura onde foi fermentada.

Através da análise da Figura 3.9, observou-se que a azeitona fresca britada apresentou composição mineral rica em sódio (886,73 mg/100 g azeitona), potássio (305,65 mg/100g azeitona) e cálcio (94,90 mg/100 g azeitona).

A maior concentração de sódio foi detetada na azeitona produzida com 8 % NaCl (2513,41 mg/100 g azeitona). A concentração de sódio na polpa da azeitona depende principalmente da concentração inicial de NaCl na salmoura, porque a penetração deste sal em azeitonas depende da difusão da salmoura para azeitona e não interfere com a presença de outros sais (Bautista-Gallego *et al.*, 2011). Por sua vez, a menor concentração de Na foi detetada na azeitona fermentada em salmoura com 4 % KCl e 3 % CaCl_2 (259,70 mg/100 g azeitona) notando-se perda de Na relativamente à azeitona fresca (627,03 mg/100 g azeitona), comprovando-se que houve difusão de sais da azeitona para a salmoura.

No que diz respeito à concentração de cálcio, parece que houve uma interação com os outros sais, especialmente com KCl, devido ao aumento da sua concentração ser mais acentuado em azeitona fermentada em salmoura com 4 % NaCl e 3 % CaCl_2 (2572,46 mg/100 g azeitona), do que a observada na presença de KCl (4 % KCl e 3 %

CaCl₂), de 2269,81 mg/100 g azeitona e de 1730,69 mg/100 g azeitona na presença dos três sais.

Em relação ao potássio, verificou-se maior concentração deste sal na azeitona fermentada com salmoura de 4 % NaCl e 4 % KCl (848,31 mg/100g azeitona) e menor concentração nas azeitonas produzidas em salmoura com 8 % NaCl (108,50 mg/100 g azeitona) e em salmoura com 4 % NaCl e 3 % CaCl₂ (152,66 mg/100g azeitona).

A concentração dos minerais na azeitona pode ser expressa em NaCl equivalente e de acordo com os resultados, o teor de sal na azeitona varia consoante a salmoura de fermentação utilizada, conforme se pode ver na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Teor de sal na azeitona de mesa fermentada em salmouras com diferentes combinações de sais (expresso em % NaCl equivalente).

Salmoura	Teor Sal (% NaCl equivalente)
8 % NaCl	6,81 ± 0,07
4 % NaCl 4 % KCl	6,55 ± 0,68
4 % NaCl 3 % CaCl ₂	10,43 ± 0,21
4 % KCl 3 % CaCl ₂	8,01 ± 0,37
2,7 % NaCl 2,7 % KCl 2 % CaCl ₂	9,80 ± 0,35

De acordo com o Trade Standard Applying to Table Olives o limite mínimo de sal (% NaCl) é de 6 %, pelo que qualquer uma das fermentações realizadas conduz a azeitona de mesa que respeita esta regulamentação.

A ingestão de 8 azeitonas em média por refeição fornece 95,4 kcal ou 88,7 kcal consoante se trate de azeitona obtida por fermentação em salmoura com 8 % NaCl ou com 4 % NaCl e 4 % KCl (Tabela 3.7). Este resultado, sugere que o consumo de azeitona de mesa obtida numa salmoura em que o cloreto de sódio foi parcialmente substituído pelo cloreto de potássio é mais saudável, pelo fato desta azeitona ser menos calórica. Relativamente aos nutrientes maioritários a ingestão desta dose por refeição fornece os valores em massa, reunidos na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 Nutrientes fornecidos pelo consumo de 8 azeitonas de mesa, expresso em gramas.

	Azeitona fermentada em 8 % NaCl	Azeitona fermentada em 4 % NaCl 4 % KCl
Humidade	20,07	21,31
Proteína	0,40	0,42
Gordura	9,23	8,83
Hidratos de carbono	2,67	1,86
Fibra	0,64	0,53
Cinzas	1,23	1,28
Energia (kcal)	95,4	88,7
Minerais		
Na	0,64	0,50
K	0,03	0,21
Ca	0,02	0,02

Quanto aos minerais (Tabela 3.7), a azeitona fermentada em salmoura de 4 % NaCl e 4 % KCl quando comparada com a azeitona fermentada em 8 % NaCl, fornece igual quantidade de cálcio, 8 vezes mais potássio e permite reduzir em 21 % a quantidade de sódio ingerido.

A ingestão diária recomendada de sódio foi definido para um máximo de 5 g por dia (Viegas, 2009). O consumo habitual de azeitona pode ser responsável por uma proporção significativa da ingestão diária de sódio. Com efeito, se considerarmos que a cada refeição se consome em média 8 azeitonas, a ingestão correspondente de sódio por dia constitui 25 % da quantidade máxima recomendada quando se refere a azeitonas fermentadas em 8 % NaCl. Este fato justifica claramente a importância da produção de azeitona de mesa verde britada com baixo teor de sódio. A substituição parcial de cloreto de sódio na salmoura, usando 4 % NaCl e 4 % KCl permite obter uma azeitona que consumida na mesma dose diária conduz a uma redução considerável (21 %) na quantidade de sódio ingerido. Além disso, o enriquecimento de azeitona de mesa com potássio e cálcio pode ter um efeito benéfico para a saúde. Uma dieta rica nestes elementos (K e Ca) é recomendada para reduzir a pressão arterial e minimizar o risco de osteoporose e cancro do cólon (Berner *et al.*, 1990).

Conclusão



4. Conclusão

A produção de azeitona britada da cultivar Maçanilha em salmouras contendo diferentes combinações de sais (8 % NaCl; 4 % NaCl e 4 % KCl; 4 % NaCl e 3 % CaCl₂; 4 % KCl e 3 % CaCl₂; e 2,67 % NaCl e 2,67 % KCl e 2,0 % CaCl₂) conduziu, no final do processo fermentativo, à redução do pH das salmouras para valores entre 4,01 e 4,2 e ao aumento da sua acidez para valores entre 0,32 e 0,59 g ácido láctico/100 mL, o que está de acordo com os limites impostos pelo “Trade Standard Applied to Table Olives”. As salmouras apresentaram concentrações em açúcares redutores que variaram entre 2,07 g/L (4 % NaCl e 4 % KCl) e 3,38 g/L (8 % NaCl) o que poderá indicar que a presença de KCl estimula a atividade microbiana. As diferentes combinações de sais nas salmouras de fermentação não interferiram negativamente no decurso da fermentação nem na qualidade microbiológica do produto final obtido.

A ausência de NaCl nas salmouras ou a sua substituição parcial por cloreto de cálcio resultou em azeitonas de mesa pouco apreciadas pelo painel de provadores. Contudo, os provadores, não identificaram diferenças entre as características organoléticas das azeitonas produzidas em 8 % NaCl e em 4 % NaCl e 4 % KCl.

Uma das características organoléticas mais importantes na apreciação da azeitona de mesa é o amargor, a qual está relacionada com a presença de compostos fenólicos. Relativamente a estes compostos, observou-se a maior retenção da sua concentração na azeitona fermentada com cloreto de cálcio e a sua menor retenção nos frutos fermentados com cloreto de sódio e de potássio, o que indica que a presença deste sal (KCl) facilita a dissolução dos compostos fenólicos na azeitona enquanto o cloreto de cálcio limita essa dissolução. Por outro lado, durante o processo fermentativo, a atividade microbiana mais intensa na presença de cloreto de potássio poderá também ser responsável por alterações químicas nos compostos fenólicos, o que pode explicar a sua menor concentração nas azeitonas produzidas nestas salmouras.

A composição nutricional da azeitona obtida por fermentação em salmouras de 8 % NaCl e de 4 % NaCl e 4 % KCl revela que azeitona fermentada em cloreto de sódio apresenta maior valor calórico (278,5 Kcal/100 g de azeitona) e maior concentração em sódio (2513 mg/100 g de azeitona) a que corresponde 6389 mg NaCl/100 g de azeitona. A concentração de sal, expressa em NaCl equivalente nesta azeitona, é de 6,8 % (considerando a presença dos iões potássio e cálcio). Em contrapartida, a azeitona de

mesa obtida por fermentação em 4 % NaCl e 4 % KCl apresenta um valor calórico inferior (258,9 Kcal/100 g azeitona), menor teor de sódio (1975,1 mg/100 g azeitona) a que corresponde 5020 mg NaCl/100 g de azeitona e um teor de potássio de 848,3 mg/100 g de azeitona). A concentração em sal expressa em NaCl equivalente nesta azeitona é de 6,6 %.

Apesar de ambas as azeitonas de mesa terem uma percentagem de sal (expressa em NaCl equivalente) de acordo com os limites estabelecidos pelo “Trade Standard Applied to Table Olives”, a azeitona fermentada em salmoura com baixa concentração de NaCl (4 % NaCl e 4 % KCl) tem menor teor de sódio, tendo-se obtido uma redução efetiva de 21 %.

A produção de azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha por fermentação em salmoura com 4 % de cloreto de sódio e 4 % de cloreto de potássio, permitiu reformular a composição em sódio daquele alimento, reduzindo o seu teor. A redução da ingestão de sódio constitui uma das melhores abordagens para a prevenção de doenças não transmissíveis, de acordo com a estratégia para o consumo de sal na alimentação em Portugal.

4.1 Perspetivas de trabalho futuro

O efeito da substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio no processo de produção de azeitona de mesa verde britada da cultivar Maçanilha, pode constituir uma alternativa competitiva no mercado pois contribui para uma alimentação mais saudável. Contudo, são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento sobre este produto e viabilizar a sua comercialização, tais como:

- Realizar um “scale up” do processo fermentativo, a nível industrial, com vista à produção de azeitona de mesa com baixo teor de sal, utilizando salmouras constituídas por NaCl e KCl.
- Estudar o perfil microbiológico das fermentações realizadas com diferentes combinações de sais.
- Estudar o efeito da presença de outros sais (cloreto de magnésio e cloreto de zinco) na salmoura de fermentação e de armazenamento de azeitona de mesa.
- Estudar a fermentação de azeitona em salmouras com diferentes combinações de sais e culturas starter probióticas.

Referências Bibliográficas



5. Referências Bibliográficas

Almeida, M. (1997). *Princípios Básicos de Alimentação e Nutrição*. Universidade Aberta, Lisboa.

Alves, M. (2010). *Produção industrial de azeitona verde no Algarve: Parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Tese de Mestrado*. Universidade do Algarve, Faro.

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

Aponte, M.; Ventorino, V.; Blaiotta, G.; Volpe, G.; Farina, V.; Avellone, G.; Lanza, C. M.; Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, **27**, 162-170.

AOAC (1975). *Official Methods of Analysis*, 12th ed.; Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; Horwitz W., Ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA; Volume II, 1-3.

Arroyo-Lopez, F. N.; Duran-Quintana, M.C.; Romero, C.; Rodriguez-Gomez, F.; Garrido-Fernandez, A. (2007). Effect of storage process on the sugars polyphenols, color and microbiological changes in cracked Manzanilla-Aloreña table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7434-7444.

Arroyo-López, F. N.; Bautista-Gallego, J.; Durán-Quintana, M.C.; Rodríguez-Gómez, F. (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.; Segovia-Bravo, K. A.; Garcia-Garcia, P.; Duran-Quintana, M.C.; Romero, C.; Rodriguez-Gomez, F.; Garrido-Fernández, A. (2009). Instability profile of fresh packed “seasoned” Manzanilla-Aloreña table olives. *LWT- Food Science and Technology*, **42**, 1629-1639.

Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F. N.; Durán-Quintana, M. C.; Garrido-Fernández, A. (2010). Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures, *Food Microbiology*, **27**, 403-412.

Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F. N.; Gil, R. V.; Rodríguez Gómez, F.; García, G. P. (2011a). Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, **28**, 1316-1325.

Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F. N.; López-López, A.; Garrido-Fernández, A. (2011b). Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT – Food Science and Technology*, **44**, 120-129.

Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Barrio, E.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A.; Arroyo-López, F. N. (2011c). Exploring the yeast biodiversity of green table olive

industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, **147**, 89-96.

Berner, L.A.; McBean, L. D.; Lofgreen, P. A. (1990). Calcium and chronic disease prevention: challenges to the food industry. *Food Technology*, **44**, 50-70.

Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *Europaean Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 229-242.

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.

Codex Alimentarius (1981). Codex Standard for Table Olives. Codex Stan 66.

COI – Conselho Oleícola Internacional (2012), [em linha], [consultado 10 Novembro de 2012], disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/news/index/660-year-2012-news>.

COI – Conselho Oleícola Internacional (2004). Trade Standard Applying to Table Olives. International Olive Oil Council. COI/OT/NC n° 1, Dezembro de 2004.

Commission Directive 2008/100/EC, of 28 October 2008, amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labeling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Official Journal of the Europaean Union* 2008, L 285/9.

Conde, C.; Delrot, S.; Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, **165**, 1545-1562.

Costa, M. & Bragança, N. (2008). A importância do sal na idade pediátrica. Uma preocupação crescente. Hospital Fernando Fonseca – Serviço de Medicina, Amadora.

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.

Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 Junho - relativo aos suplementos alimentares comercializados como géneros alimentícios e apresentados como tais, os quais podem ser postos à disposição do consumidor final sob a forma pré-embalada.

Europaean Comission (2008). Collated Information on Salt Reduction in the EU.

Eskin, K. & Robinson, D. (2001). Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological changes. CDC Press, New York.

Fernández, A. G.; Fernández Díez, M. J.; Adam, M. R. (1997). Table Olives. Production and Processing. Chapman & Hall, London, UK.

Fernández-Díez, M. J.; Castro, R.; Garrido, A.; Cancho, F. G.; Pellissó, F. G.; Vega, M. N.; Moreno, A. H.; Mosquera, I. M.; Rejano, L.; Quintana, M. C. D.; Roldán, P. S.; García, P.; Castro, A. (1985). Biotecnología de la aceituna de mesa. Madrid, Spain, CSIC, Ed.

- Ferreira, F. A. (1994). *Nutrição humana*. 2ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Foods from Spain (2013). Manzanilla table olives, [em linha], [consultado a 20 Junho de 2013], disponível em: http://www.foodsfromspain.com/icex/cda/controller/pageSGT/0,9459,35868_6908150_6912165_4536316_396055383,00.html
- Galanakis, C.M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 175-184.
- Ghanbari, R.; Anwar, F.; Alkharfy, K. M.; Gilani, A. H.; Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 3291-3340.
- Gómez, A. H. S.; García, P. G.; Navarro, L. R. (2006). Trends in table olives production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, **57**, 86-94.
- Graça, P. (2013). Relatório. Estratégia para a redução do consumo de sal na alimentação em Portugal. Direção Geral de Saúde. Ministério de Saúde, 1-27.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing. London
- Kailis, S. & Harris, D. (2007). *Producing Table Olives*. Land Links, Australia.
- Kouraba, K.; Ribes, G.; Blanco, R.; Revuelta, J.; Barranco, N. (2004). Suitability of olive varieties for mechanical harvester shaking. *Olivae*, **101**, 39-43.
- Leiba, A.; Vald, A.; Peleg, E.; Shamiss, A.; Grossman, E. (2005). Does dietary recall adequately assess sodium, potassium and calcium intake in hypertensive patients? *Nutrition*, **21**, 462-466.
- López, A.; García, P.; Garrido, A. (2008). Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition. *Food Chemistry*, **106**, 369-378.
- López-López, A.; Jiménez- Araujo, A.; García-García, P.; Garrido-Fernández, A. (2007). Multivariate Analysis for the Evaluation of Fiber, Sugars, and Organic Acids in Commercial Presentation of Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 10803-10811.
- Lourenço, S. (2009). A nossa comida está cheia de sal. Associação Portuguesa dos Nutricionistas, *APN News*, Porto.
- Macedo, M. E.; Lima, M.J.; Silva, A. O.; Alcântara, P.; Ramalinho, V.; Carmona, J. (2007). Prevalência, Conhecimento, Tratamento e Controlo da Hipertensão em Portugal. Estudo PAP. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, **26**, 21-39.
- Maldonado, M.B., Zuritz, C.A., Assof, M.V. (2008). Diffusion of glucose and sodium chloride in green olives during curing as affected by lye treatment. *Journal of Food Engineering*, **84**, 224-230.
- Malheiro, R.; Casal, S.; Sousa, A.; Pinho, P. G.; Peres, A. M.; Dias, L. G.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2012). Effect of Cultivar on Sensory Characteristics, Chemical Composition, and Nutritional Value of Stoned Green Table Olives. *Food Bioprocess Technology*, **5**, 1733-1742.

- Maroco, J. (2003). Análise estatística com utilização do SPSS. Lisboa. Edições Sílabo.
- Marsilio, V.; Campestre, C.; Lanza, B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55-60.
- Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C.; García, A.; Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9817-9823.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2007). Olivicultura. Gabinete de Planeamento e Políticas, 1-52.
- Morales-Sillero, A.; Jiménez, R.; Fernández, J.E.; Troncoso, A.; Rejano, L. (2008). Effect of Fertigation on the “Manzanilla de Sevilla” Table Olive Quality Before and After “Spanish-style” Green Processing. *HortScience*, **43**, 153-158.
- Norma Portuguesa (NP) 518, 1986. Cereais e leguminosas. Determinação do teor de cinza. Processo por incineração a 550 °C.
- Nogueira, F. (2012). Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspetos morfológicos, químicos e microbiológicos. *Tese de Mestrado*. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.
- Nout, M. J. R. & Rombouts, F. M. (2000). Fermented and Acidified Plant Foods, in Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume I. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Othman, N. B.; Roblain, D.; Chammen, N.; Thonart, F.; Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116**, 662-669.
- Panagou, E. Z.; 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.
- Portaria n.º 646/1993 de 6 de Julho - relativa a aplicação de aditivos alimentares nos géneros alimentícios e regras relativas à sua utilização.
- Recenseamento Agrícola (2009). Instituto Nacional de Estatística (INE), [em linha], [consultado 28 Dezembro de 2012], disponível em: www.ine.pt
- Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011, altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares.

- Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J. L.; Fernández-Bolaños, J. (2009). Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 483-490.
- Rodríguez-Gómez, F.; Bautista-Gallego, J.; Romero-Gil, V.; Arroyo-López, F. N.; Garrido-Fernández, A.; García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT - Food Science and Technology*, **46**, 56-63.
- Rodrigues, N. (2011). Estudo da evolução da microbiota em fermentações naturais de azeitona verde do Algarve. *Tese de Mestrado*. Universidade do Algarve, Faro.
- Romeo, F.V.; Piscopo, A.; Mincione, A.; Poiana, A. (2012). Quality evaluation of different typical table olive preparations (cv Nocellara del Belice), *Grasas y Aceites*, **63**, 19-25.
- Romeo, F.V.; Luca, D.S.; Piscopo, A.; Perri, E.; Poiana, M. (2009). Effects of post-fermentation processing on the stabilisation of naturally fermented green table olives (cv Nocellara etnea), *Food Chemistry*, **116**, 873-878.
- 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.
- Ross, R.; Morgan, S.; Hill, C. (2002). Preservation and Fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 3-16.
- Samapundo, S.; Ampofo-Asiama, J.; Anthierens, T.; Xhaferi, R.; Van Bree, L.; Szczepaniak, S.; Goemaere, O.; Steen, L.; Dhooge, M.; Paelinck, H.; Dewettinck, K.; Devlieghere, F. (2010). Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham and white sauce. *International Journal of Food Microbiology*, **143**, 9-16.
- Sakouhi, F.; Harrabi, S.; Absalon, C.; Sbei, K.; Boukhchina, S.; Kallel, H. (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europaea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, **108**, 833-839.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.
- Sleator, R. D. & Hill, C. (2007). Food reformulation for improved health: a potential risk for microbial food safety? *Medical Hypotheses*, **69**, 197-202.
- Sousa, A.; Casal, S.; Bento, A.; Malheiro, R.; Oliveira, M. B. P. P.; Pereira, J. A. (2011). Chemical Characterization of “Alcaparras” Stoned Table Olives from Northeast Portugal. *Molecules*, **16**, 9025-9040.
- Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J. A. (2006). Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 8533-8538.

Sperber, W. H. (1983). Influence of water activity on foodborne bacteria – a review. *Journal of Food Protection*, **46**, 142-150.

Viegas, C. (2009). Consumo de Sal numa Escola de Hotelaria. *Segurança e Qualidade Alimentar*, **6**, 34-38.

Viegas, C. (2008). Sal e doença cardiovascular. *Revista factores de Risco*, **10**, 12-18.

Wood, B. J. B. (1998). *Microbiology of Fermented Foods*, Vol 1. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Anexos



Anexo I

Ficha de análise sensorial às diferentes azeitonas de mesa.

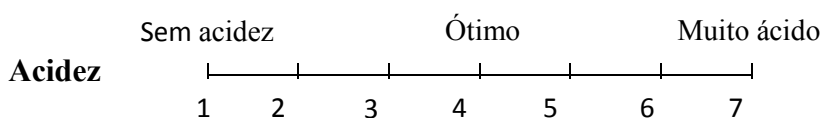
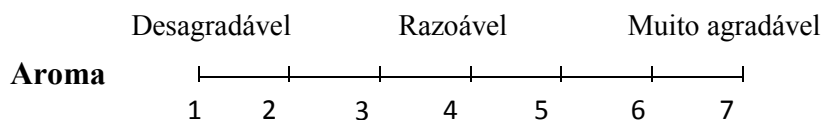
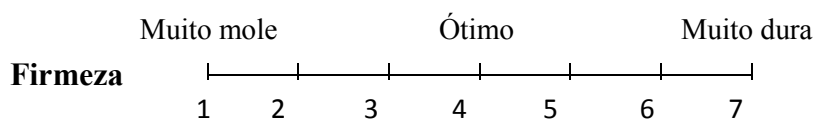
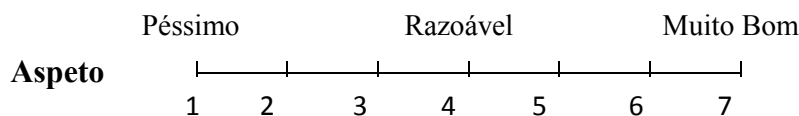


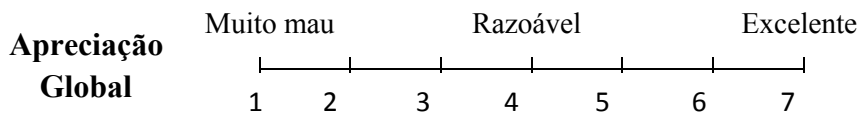
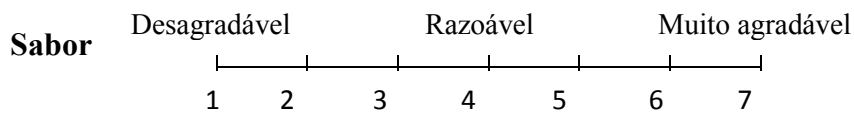
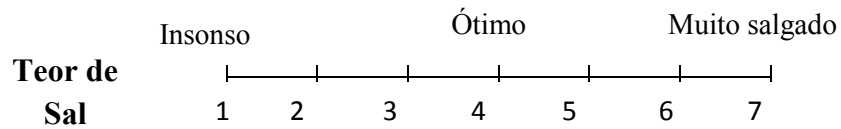
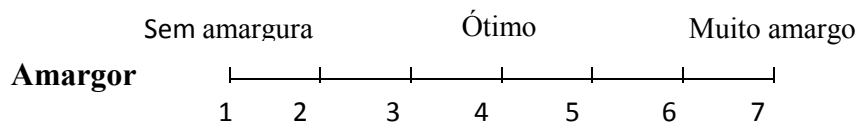
Mestrado Tecnologia de Alimentos
Análise Sensorial – Azeitonas de Mesa
2012/2013

Nome: _____

Data: _____

Anote os códigos das amostras que recebeu de acordo com a posição no tabuleiro, observe-as, prove-as, avalie e anote as características indicadas de acordo com cada uma das escalas de 1 a 7 na tabela a baixo.






Atributos	Amostras				
Aspetto					
Firmeza					
Aroma					
Acidez					
Amargor					
Teor de sal					
Sabor					
Apreciação global					

Observações: _____

Anexo II


Poster apresentado no congresso “Internacional Food Congress – Novel Approaches in Food Industry”, 26-29 Maio de 2014, em Kusadasi, Turquia.



UAIG ISE
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Cracked Green Table Olives Produced with Low NaCl Content

C. Saúde^a, C. Quintas^{a,c}, P. Pires-Cabral^{a,b}
a38131@uaig.pt; cquintas@uaig.pt; pcabral@uaig.pt
^aInstituto Superior de Engenharia, Campus da Penha, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal;
^bInstituto Superior de Agronomia, CEER-Sisystems Engineering, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal;
^cICQA, Campus de Gambelas, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal.



Introduction

Table olives are recognized as a valuable source of beneficial compounds for health and an important component of the Mediterranean Diet. Cracked green table olives from the Manzanilla cultivar are characterized by a fresh natural green colour, a rich aroma and typical bitter taste. These olives are included in the category of “natural olives” which undergo a spontaneous fermentation carried out by fruit and environmental microbiota, with yeasts found to be the dominant group (Alves et al. 2012).

Traditional fermentation of green olives from Manzanilla cultivar produces table olives characterized by excellent organoleptic properties, but with high sodium chloride concentration. Reduction of sodium chloride content is a concern of preventive medicine and a goal of the food industry in the reformulation of foods.

The aim of this work was to study the influence of partial replacement of NaCl by KCl in the fermenting brines on the properties of cracked green table olives of the Manzanilla cultivar.

Materials and Methods

Raw Manzanilla olives were harvested at their mature stage of ripening (October) by producers in the south of Portugal.

Fresh cracked olives were prepared by a local industry.

After crushing, olives were washed and immersed in brine solutions with different salt combinations: 8 % NaCl or 4 % NaCl + 4 % KCl.

Fermentations proceeded spontaneously and, after 5 months, table olives and brines were analysed for organoleptic and physicochemical evaluation.

Results and Discussion

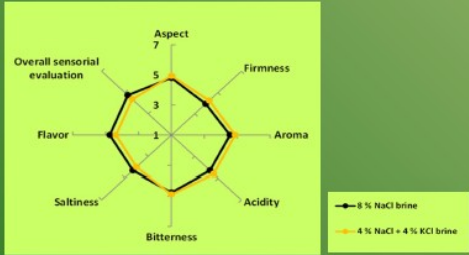
- Physicochemical characteristics of brine solutions, after osmotic equilibrium with olives, were within the limits established by the Trade Standard Applying to Table Olives*.

	8 % NaCl brine	4 % NaCl + 4 % KCl brine	Trade Standard*
pH	4.01 ± 0.01	4.09 ± 0.01	≤ 4.3
Titratable Acidity (% lactic acid)	0.390 ± 0.005	0.368 ± 0.001	≥ 0.3
Salt Content (%)	6.81 ± 0.07	6.55 ± 0.48	≥ 6

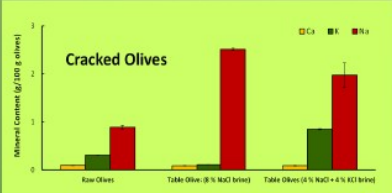
- Cracked green table olives of Manzanilla cultivar are rich in moisture and fat. There are no differences in nutritional composition of table olives fermented with 8 % NaCl or 4 % NaCl + 4 % KCl brine solutions.

	8 % NaCl brine	4 % NaCl + 4 % KCl brine
Moisture (g)	58.63 ± 0.36	62.26 ± 1.92
Protein (g)	1.17 ± 0.01	1.22 ± 0.01
Lipid (g)	26.96 ± 0.32	25.80 ± 1.56
Ash (g)	3.58 ± 0.24	3.72 ± 0.15
Fibre (g)	1.87 ± 0.14	1.55 ± 0.09
Carbohydrate (g)	7.79 ± 0.86	5.46 ± 0.52
Energy (kcal)	278.52 ± 0.87	258.91 ± 15.97

- Table olives fermented with 8 % NaCl or 4 % NaCl + 4 % KCl brine solutions presented similar organoleptic characteristics.



- A lower content of sodium was observed in the table olives fermented with 4 % NaCl + 4 % KCl brine.



References

Trade Standard Applying to Table Olives—COI/OT/NC N.º 1 (December 2004).
 Alves, M., Gonçalves, T., Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23: 263-268.

Conclusions

- Cracked green table olives of Manzanilla cultivar with lower NaCl content were obtained by fermentation in 4% NaCl + 4% KCl brine solution as opposed to olives fermented in brine (8% NaCl).
- Physicochemical and sensory evaluation of table olives produced in 8 % NaCl or 4 % NaCl + 4 % KCl fermenting brines showed similar results.

