



# VIII

## Simpósio Nacional de

# OLIVICULTURA



2020

## **FICHA TÉCNICA**

**Título:** VIII Simpósio Nacional de Olivicultura

**Coleção:** Actas Portuguesas de Horticultura, N.º 31

### **Propriedade e edição**

Associação Portuguesa de Horticultura (APH)

Rua da Junqueira, 299, 1300-338 Lisboa

<http://www.aphorticultura.pt>

### **Editores**

Nuno Rodrigues

Ana Cristina Ramos

José Alberto Pereira

### **Grafismo da capa:**

Nuno Rodrigues

**ISBN:** 978-972-8936-38-9

**Ano:** 2020

## **Comissões**

### **Comissão organizadora**

Ana Cristina Ramos (INIAV; APH)  
Cristina Sempiterno (INIAV)  
Francisco Pavão (CAP)  
José Alberto Pereira (CIMO/ESA-IPB; APH)  
Margarida Oliveira (ESA-IPS)  
Nuno Barba (ESA-IPS)  
Nuno Rodrigues (CIMO/ESA-IPB; APH)  
Pedro Jordão (INIAV), Presidente  
Rocío Arias Calderón (INIAV; APH)

### **Comissão científica**

Ana Paula Silva (CITAB/UTAD)  
António Cordeiro (INIAV)  
António Ramos (ESA/IPCB)  
Augusto António Peixe (Univ. Évora)  
Encarnação Marcelo (INIAV)  
Fátima Peres (ESA-IPCB)  
Isabel Ferreira (ISA-UL)  
José Alberto Pereira (CIMO/ESA-IPB; APH), Presidente  
José Peça (Univ. Évora)  
Laura Torres (CITAB, UTAD)  
Paula Baptista (CIMO/ESA-IPB)  
Pedro Reis (INIAV)

### **Secretariado**

Carlos Reis (ESA/IPB)  
Marta Madureira (ESA/IPB)

## Prefácio

A Associação Portuguesa de Horticultura (APH) tem o prazer de apresentar o volume 31 das Actas Portuguesas de Horticultura, que contém parte das comunicações apresentadas, sob a forma de comunicações orais e em painéis, no *VIII Simpósio Nacional de Olivicultura*, que decorreu em Santarém de 7 a 10 de junho de 2018.

É já longa a tradição do *Simpósio Nacional de Olivicultura*, que ao longo de oito edições sempre se assumiu como o principal fórum de discussão, das problemáticas do setor no nosso País. Este Simpósio, que decorreu no Centro Nacional de Exposições, em Santarém, foi integrado no âmbito das atividades do *World Olive Oil Summit*, durante a Feira Nacional de Agricultura de 2018, contribuiu mais uma vez para a afirmação de um setor extremamente importante da economia nacional.

Numa organização da Associação Portuguesa de Horticultura (APH) em parceria com o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém (ESA/IPS) e com o apoio do Centro Nacional de Exposições (CNEMA), o Simpósio reuniu investigadores, técnicos, profissionais dos setor, agricultores e agentes de toda a fileira. Com a divulgação dos últimos progressos técnico-científicos, o Simpósio contribuiu para a afirmação do setor da olivicultura e azeite, num período em que o setor se encontra particularmente ativo, com valores de produção nacional a serem superados anualmente.

A edição nº 31 das Actas Portuguesas de Horticultura, inclui 22, de comunicações apresentadas, quer na forma de comunicações por convite, apresentações orais ou em painel, agradecendo o esforço dos autores na preparação dos manuscritos.

A realização deste Simpósio só foi possível graças ao empenho de uma vasta equipa. A todos os membros da Comissão Organizadora, da Comissão Científica, do Secretariado, bem como aos oradores convidados, autores de comunicações, às entidades que se associaram, que de uma forma direta ou indireta, apoiaram ou patrocinaram a realização deste evento, endereçamos os nossos sinceros agradecimentos.

Um grande bem-haja a todos.

*Nuno Rodrigues*

*Ana Cristina Ramos*

*José Alberto Pereira*

## Índice

<b>Sessão I – Ecofisiologia, Recursos Naturais e Melhoramento .....</b>	<b>1</b>
Establecimiento de áreas de alto valor paisajístico en olivar de ribera .....	2
Seguimiento de los cultivares y acebuches de olivo a lo largo de las cuencas fluviales del Este de la Península Ibérica .....	6
<b>Sessão II – Proteção da Oliveira.....</b>	<b>11</b>
Os vetores potenciais de <i>Xylella fastidiosa</i> no olival alentejano e o papel da artropodofauna auxiliar na sua limitação natural .....	12
Avaliação do potencial antimicrobiano de endófitos de oliveira para uso como agentes de controlo biológico de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	24
Relação entre a infeção por <i>Xylella fastidiosa</i> e estado nutricional de plantas hospedeiras .....	33
Captura em massa de <i>Bactrocera oleae</i> no sul de Portugal .....	42
<b>Sessão III – Sistemas e Técnicas Culturais.....</b>	<b>50</b>
Oliveira, a antiga arte de não morrer de fome nem de sede: estudos no Baixo Alentejo.....	51
Resposta de oliveiras jovens à aplicação de macro e micronutrientes .....	58
Adecuación de aportes de fertilización complementaria en olivar intensivo con riego deficitario controlado.....	67
Desenvolvimento de uma ferramenta para estimativa da produção de azeitona em olival em sebe .....	73
Momento ótimo de maturação para a colheita de cinco variedades de oliveira da região do Alentejo .....	81
<b>Sessão IV – Tecnologia, Qualidade .....</b>	<b>87</b>
Azeites Virgens de Agricultura Biológica na Região de Idanha-a-Nova.....	88
Reduction of acrylamide content in Californian-style black olives .....	94
Caracterização de Azeites Virgens da Região das Beiras e Serra da Estrela .....	101
Análise comparativa de acidez em ácido oleico e perfil de ácidos graxos de azeites produzidos no Brasil, Argentina e Espanha .....	108
Utilización de la fluorescencia intrínseca de las aceitunas Ascolana Tenera en combinación con quimiometría para la monitorización del proceso de elaboración ...	113
Contributo para a caracterização de azeitona de mesa de fermentação natural de Trás-os-Montes das cvs Negrinha de Freixo e Cobrançosa.....	117
Produção de Farinha de Polpa de Azeitona de Conserva “Negrinha de Freixo” .....	123
Caracterização físico-química de farinhas de azeitona produzidas por diferentes métodos de secagem.....	129
Avaliação do valor atribuído pelos consumidores ao azeite de oliveiras centenárias ..	134
Conhecimentos, preferências e hábitos de consumo relativamente ao azeite em Portugal .....	141
Perfil enzimático de leveduras isoladas durante o processamento de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo.....	149

**Sessão I – Ecofisiologia, Recursos Naturais e**  
**Melhoramento**

## **Establecimiento de áreas de alto valor paisajístico en olivar de ribera**

Inmaculda Marqués-Pérez<sup>2</sup>, Isabel López-Cortés<sup>1</sup> & Domingo M. Salazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Universitat Politècnica de València. islocor@upv.es

<sup>2</sup>Departamento de Economía y Ciencias Sociales. Universitat Politècnica de València. INECO.

### **Resumen**

Tras el interés suscitado por conservar y monitorizar los sistemas paisajísticos y agrarios de alto valor natural (AHNV), así como detectar el abandono de cultivo en la proximidad de las cuencas, ha sido constatada la poca incidencia real de las actuaciones de conservación en la mejora de la biodiversidad existente en dichas zonas.

Los acebuches junto con los olivos dispersos en las zonas de ribera suponen un valor constante a lo largo de los años en las zonas agrarias y en las zonas de ribera próximas. Se estableció la necesidad de empezar el estudio en las cuencas fluviales de los ríos Palancia y Turia, dado que históricamente han sido zona clara de migración humana y posible dispersión agraria, siéndolo también de material olivícola.

La búsqueda de estas interrelaciones nos permitirá determinar no solo la mejora o disminución de biodiversidad, existente en las cuencas fluviales, sino determinar qué implicación pueden tener el acebuche y el olivo en el asentamiento y mejora de las zonas. Estas zonas son paisajes agrarios ya desarrollados por el hombre y que en estos momentos suponen la base de una olivicultura establecida y con valor agronómico y paisajístico. Sin embargo, muestran una clara degradación en su entorno, que ha obligado a la pérdida tanto de material vegetal como de enclaves de piedra seca usados históricamente en estas zonas agrarias.

Todo ello debe ser constatado mediante la combinación de técnicas de catalogación y cálculos biomásicos que permitan establecer cuáles son los límites necesarios para lograr una mayor biodiversidad dentro del conjunto olivarero de la zona en estudio.

Ante esta situación se plantea como objeto de este estudio determinar las interrelaciones entre la conservación de la biodiversidad y las condiciones de manejo, sobreexplotación y conservación, de los acebuches y olivares presentes en las cuencas fluviales mediterráneas.

**Palavras-chave:** Olivicultura; Zona de ribera; AHNV; Valorización; Biomasa.

### **Abstract**

After the interest aroused by to conserve and monitoring the landscape and agricultural systems of high natural value (AHNV), as well as detect the abandonment of cultivation in the proximity of the basins has been found the little real impact on the improvement of the existing biodiversity in these areas.

With this situation it arises as the object of this study to determine the interrelationships between the conservation of biodiversity and the conditions of exploitation, management and conservation of wild olives and olive trees present in the Mediterranean basin.

The wild olive trees together with the olive trees scattered in riparian zones have a constant value over the years in the agricultural areas and in riparian zones.

It was established the need to start the study in the basins of the Palancia River and Turia River, these rivers given that historically have been clear zone of human migration and possible dispersion, so also of material for olives and olive oil.

The search for these interrelations will allow us to determine not only the improvement or decline in biodiversity, existing in river basins, but determine that possibility of involvement can have the wild olive and the olive tree in the settlement and improvement areas.

These areas are agricultural landscapes already developed by the man historically and that in these moments constitute the introduction of an olive growing and agronomic value and landscape. However, they show a clear degradation of the landscape in your environment, which has led to the loss of both plant material as enclaves of dry stone used historically in these agricultural areas.

All this must be found through the combination of techniques of cataloguing and biomass calculations to establish what the limits are necessary to achieve greater biodiversity within the whole olive of the study area.

**Keywords:** Oliviculture; Riparia areas AHNV; Recovery; Biomass.

## Introducción

La capacidad de crecimiento de las distintas especies está caracterizada genéticamente. Bajo esta situación la estructura habitual en un bosque de ribera está constituida por muchos pies de pequeño tamaño que reparten los recursos sin llegar a establecer un individuo dominante (Alvis, 2009). Ello obliga a determinar una jerarquía homogenizada donde los crecimientos biomásicos son prácticamente insignificantes.

Por otra parte, la situación actual de las riberas de los ríos, en los que no existe una clara regulación del caudal del río, junto con una gran falta de cuidados en las zonas riparias obliga a esta situación (Díaz *et al*, 2003).

Sin embargo, se detecta y puede llegar a catalogarse la presencia de individuos de acebuche u olivo salvaje muy interesantes tanto desde el punto de vista biomásico como paisajístico.

Su valor no está solo en el aporte paisajístico, con gran importancia en las zonas riparias. Sino también en las posibilidades que encontramos en estos acebuches como acumuladores de carbono. A la vegetación leñosa se le asume que el 50% de su peso seco (biomasa) es acumulación de carbono. Por lo que es de gran interés no solo su presencia sino el estudio y evolución de estas unidades arbóreas en las zonas de ribera como sumideros a la que vez que generadores de biodiversidad (Delgado & Martínez, 2009).

Las riberas de los ríos están claramente degradadas, pero esta degradación no afecta únicamente a su extensión (González de Tánago, 1999), sino también al grado de naturalidad de las mismas.

Podemos comprobar una gran fragmentación en todas las zonas de ribera, pero existe un patrón de dispersión en la distribución de especies y usos de los mismos.

Hoy en día existe una gran percepción ambiental en la sociedad que recomienda incluir en ella la recuperación paisajística de las áreas de ribera y su vegetación buscando caracterizar estas áreas e identificar elementos principales o pioneros en dichas zonas. (Ibero, 1996).

En estudios previos se detectó la necesidad de mantener y conservar las áreas agrarias de alto valor natural (AHNV). Pero al mismo tiempo resultaba necesario detectar el abandono que estas áreas estaban sufriendo a lo largo de los últimos años. Sin embargo,



ese abandono no ha implicado una incidencia medible en la mejora de la biodiversidad existente en dichas zonas.

Por ello, nos planteamos establecer las interrelaciones entre sistemas de conservación de biodiversidad y sus formas de manejo, sobreexplotación y futura conservación de los olivos presentes en las cuencas fluviales de los dos ríos estudiados.

### **Material y Métodos**

Para realizar este estudio se catalogaron los individuos localizados en ambas zonas riparias realizando una clasificación biomásica de los individuos.

Para poder llevar adelante el estudio se establecieron cuatro grandes grupos en función de la componente biomasa del acebuche. Sus dimensiones y características fueron comparadas con las especies circundantes. De esta forma pudo deducirse si el patrón de crecimiento y/o degradación de cada grupo preestablecido guardaba correlación con la especie presente en su hábitat.

Hemos partido de los mapas de distribución de zonas agrarias y forestales realizadas en el año 2011 (Olivero *et al.*, 2011), en el que fueron catalogadas todas las zonas riparias o no de la Comunidad Valenciana.

### **Resultados y Discusión**

Los acebuches localizados al igual que los olivos dispersos en las zonas de ribera estudiadas suponen un valor constante a lo largo de los años. Su presencia ha quedado constatada no solo por el material hemerográfico consultado sino también por la distribución encontrada a lo largo de las riberas de los ríos Palancia y Turia ambos situados al este de la Península Ibérica.

Estos ríos han sido una clara zona de migración humana lo que ha supuesto al mismo tiempo una vía de dispersión de materiales de olivo (Martínez, 2000).

Por este motivo se ha estudiado la posible implicación del olivo y el acebuche en el asentamiento humano a lo largo de estas zonas agrarias. Han podido detectarse grandes enclaves de acebuches entrelazados con masas forestales claramente dominantes en estas zonas de ribera.

Ha sido separado claramente el valor natural de los acebuches del resto de especies riparias. Se ha obtenido un indicador mejorable, pero para nada influenciado por especies foráneas a la zona de dispersión y desarrollo del acebuche (Escarreé, 1984).

Determinando que las zonas que en el año 2011 se clasificaron como de alto valor natural por el gran número de explotaciones dedicadas al cultivo del olivo de secano (Olivero *et al.*, 2011) son coetáneas y colindantes a las áreas riparias donde hemos localizado los acebuches.

### **Conclusiones**

La falta de accesibilidad detectada en ciertas zonas de los ríos Palancia y Turia han permitido establecer zonas de salvaguarda y dispersión de acebuches, al igual que pudo determinar González de Tánago (1999) en otras cuencas fluviales de España.

No todas las áreas catalogadas en las riberas debemos clasificarlas como desfavorecidas, sino que en algunos casos son zonas de alta diversidad tanto paisajística como biomásica.

La presencia de acebuches ha sido en el 25% de los casos estudiados, a lo largo de las riberas de los ríos, elementos dominantes. Se establece por lo tanto la presencia clara de una jerarquización biomásica en las zonas de estudio.

Son zonas con alto valor natural y con gran diversidad de usos y formas estructurales. Apareciendo normalmente una distribución uniforme y coherente con la zona agraria colindante, ello obliga a pensar en una posible cohesión con las zonas agrarias como forma de dispersión agrícola en las zonas de ribera.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 20170734. Desarrollo de métodos de cuantificación de biomasa en vegetación riparia para el manejo de cuencas en la Comunidad Valenciana. Dirección General de Universidades. Generalitat Valenciana. Valencia. España.

### **Referencias**

- Delgado, J.A. & Martínez, T. (2009). Acumulación de biomasa y carbono en zonas de bosque natural y restauradas en áreas de ribera. En 5º Congreso Forestal Español. Junta de Castilla y León.
- Díaz Y., Martínez T., Martínez M. (2003). Biomasa en enclaves riparios naturales y su efecto en la producción de carbono. En VII Congreso nacional de la asociación española de ecología terrestre. España ante los compromisos del Protocolo de Kyoto: Sistemas naturales y cambio climático.
- Escarre, A. Gracia, C. Rodá, F. & Terradas J.; 1984. Ecología del bosque esclerófilo mediterráneo. Investigación y Ciencia 95.
- González de Tánago M. (1999). El agua a debate desde la universalidad: hacia una nueva cultura del agua. 1º Congreso Ibérico sobre Gestión y Planificación de aguas: 499-512.
- Ibero C. (1996). Ríos de vida. El estado de conservación de las riberas fluidas en España. SEO/Bird life.
- Malason G. P. (1996). Riparian landscape. Cambridge Studies in Ecology. Cambridge University Press.
- Martínez T. (2000). La vegetación de ribera del Río Henares en la Comunidad de Madrid. Consejería de Medio Ambiente. Comunidad de Madrid.
- Olivero J., Márquez A. L., Arroyo B. (2011). Modelización de las áreas agrarias y forestales de alto valor natural en España. IREC.

## **Seguimiento de los cultivares y acebuches de olivo a lo largo de las cuencas fluviales del Este de la Península Ibérica**

Isabel López-Cortés<sup>1\*</sup> & Domingo M. Salazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Departamento Producción Vegetal. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera S/N 46022 Valencia. Spain. islocor@upv.es

### **Resumo**

En la Cuenca Mediterránea y en concreto en la Comunidad Valenciana con Denominación de aceite “Oli de la Comunitat Valenciana”, el olivo ocupa las partes más secas e interiores. Cultivándose principalmente en las laderas y lomas de los cinco ríos que cruzan la Comunidad. Todo ello supone alrededor de 105.000 ha en cultivo.

La introducción por fenicios y romanos de este cultivo ha dejado verdaderos monumentos vivos en distintas comarcas olivareras.

Siguiendo el valle de los ríos han sido identificados numerosos cultivares (mediante norma UPOV TG/99/4 y CPVO-TP/099/1) de los que se han estudiado además las características de cata y composición ácida de esteroides y polifenoles de sus aceites.

Mediante técnicas RFLP ISS se han identificado diversos acebuches (denominados ullastres) en parte de nuestro territorio, la mayoría de ellos asilvestrados al ser concordantes en los estudios que se están realizando con los cultivares prospectados en el valle correspondiente. En algunos casos no se ha encontrado relación alguna con estos por lo que se ha procedido a su caracterización pomológica y se está procediendo al estudio de sus aceites, habiendo comenzado a estudiar su ADN comparativamente con el banco de germoplasma de olivo de España.

Como conclusión, se establecerá en los próximos años de estudio un mapeo de movimiento del olivar que permitirá en un futuro establecer un esbozo de la filogenia de los acebuches y cultivares en nuestras zonas de cultivo.

**Palavras-chave:** Olivicultura; Acebuche; Caracterización, Identificación.

### **Abstract**

In the Mediterranean Basin and specifically in the Valencian Community with the Olive Oil Denomination “Oli de la Comunitat Valenciana”, the olive tree occupies the driest and inner parts. Mainly cultivated on the slopes and hills of the five rivers that cross the Community. All of this represents around 105.000 ha in cultivation.

The introduction, by Phoenicians and Romans of this crop has left true monuments alive in different groves.

Following the valley of the rivers, numerous cultivars have been identified (by UPOV TG/99/4 and CPVO-TP/099/1), of which the tasting and acidic composition characteristics of sterols and polyphenols of their oils have also been studied.

Through ISS RFLP techniques, several wild olive trees (they are called ullastres) have been identified in part of our territory, most of them feral by being concordant in the studies that are being carried out with the cultivars prospected in the corresponding valley. In some cases, no relationship has been found with these, so it has proceeded to its pomological characterization and is proceeding to the study of its oils, having begun to study its DNA comparatively with the olive germoplasm bank of Spain.

In conclusion will be established in the coming year study mapping the olive movement witch will in the future establish an outline of the phylogeny of wild olives and cultivares in our growing areas.

**Keywords:** Olive growing; Wild olive tree, Characterization, identification.

## **Introducción**

En las zonas de ladera de los ríos mediterráneos como en otras zonas arbóreas, los árboles capturan carbono de la atmósfera, aumentando claramente esta captación a medida que los árboles van desarrollándose.

Este almacenamiento temporal dependerá claramente de la longevidad, tamaño y reparto que la biomasa tenga a lo largo de la zona riparia (Delgado & Martínez, 2009). Sin embargo, la identificación y catalogación de las especies presentes en esta zona permite conocer con mayor detalle cuál es el papel regulador que estos individuos están realizando en las zonas riparias.

Se plantean diferentes conteos y seguimientos de las zonas de ribera al objeto de clasificar y estimar qué especie es dominante. A la vez, que nos permite identificar no solo la distribución y abundancia, sino también la especialización de las zonas estudiadas Rood & Mahoney (1990).

Estos ecosistemas desarrollan importantes funciones acutando en algunos casos como corredores ecológicos (Sterling, 1996). Consiguen mejorar la calidad de la zona de ribera y con ello aumentar la calidad ambiental en los ecosistemas terrestres y en consecuencia en estos ecosistemas acuáticos con los que están claramente interrelacionados.

Los ecosistemas de zona riparia han sido muchas veces estudiados centrándose habitualmente en el bosque natural. Sin embargo, resulta necesaria la presencia de olivos silvestres que junto con otras especies leñosas conforman un ecosistema peculiar y necesario, a la vez que una clara zona de dispersión y establecimiento de los cultivos Borges *et al* (2017).

La presencia de los olivos asilvestrados u olivastros sugieren las posibles zonas de movimiento ecoambiental del olivar a lo largo de la Comunidad Valenciana y por tanto de nuestras zonas olivícolas. Por ello es necesario catalogar, diferenciar y caracterizar los olivastros presentes en las principales zonas riparias de nuestra Comunidad.

## **Material y Métodos**

Para realizar este estudio se han seguido las cuencas fluviales de los cuatro ríos de la Comunidad Valencian (este de la Península Ibérica). Tras el seguimiento y control de estas zonas de ribera, se determinó una mayor presencia en las riberas de los ríos Palancia y Turia, por lo que se centró finalmente el trabajo en estos dos ríos que constituyen los dos ríos principales presentes en la Comunidad. Y al mismo tiempo discurren por las principales zonas olivareras.

Se caracterizan mediante norma UPOV todo el material olivícola localizado. Se realizó un seguimiento de la biomasa presente en esas zonas, estableciendo prioridad en los acebuches de las zonas riparias y los cultivares de olivo de las riberas próximas y en explotación agraria.

## **Resultados y Discusión**

En la caracterización de las riberas de los ríos Palancia y Turia hemos podido localizar la presencia de numerosos olivos salvajes u olivastros, como son denominados en las zonas de estudio.

En algunas zonas son verdaderos monumentos vivos presentes a lo largo de las zonas olivícolas de estudio. Pero esta monumentalidad nos indica no solo su longevidad sino también su perfecta adaptación ecoambiental a dichas zonas.

La localización de los individuos se vio seguida de una caracterización de los mismos mediante la norma UPOV TG/99/4 y CPVO-TP/099/1, para en posteriores estudios realizar su seguimiento mediante sus aceites y su caracterización tanto organoléptica como química en composición acídica, esteroides y tocoferoles.

Resultó necesario estudiar los olivastros u olivos salvajes que están presentes, y ello nos ha permitido determinar ciertas similitudes a los cultivares existentes en esas zonas de estudio.

Esas similitudes no se cumplen siempre puesto que hay olivastros que en alguna de las cuencas fluviales no se parecen en absoluto a los olivos cultivados en la proximidad de las mismas.

Se decidió realizar un estudio de la biomasa como sistema de comparación entre ambas zonas silvestre en la zona riparia y los olivos cultivados en la proximidad de la ribera de los ríos.

Para ello se realizaron dos modelos, un primer modelo de olivastros cuyos resultados biomásicos han resultado similares al cultivar Serrana cuyo cultivo es habitual en la zona próxima al río Palancia (Tabla 1 y 2). Y un segundo modelo de olivastro del que se han obtenido resultados de biomasa similares a las Blanquetas, este modelo estaba mayoritariamente presente en la cuenca del río Turia (Tabla 3).

## **Conclusiones**

Ha podido realizarse la identificación de diversos acebuches u olivastros en parte del territorio de los ríos. La mayor parte de ellos son concordantes con los datos y caracterizaciones de los cultivares prospectados en el valle correspondiente, por este motivo se decidió finalmente localizar los ríos en aquellos con valles históricamente olivícolas, como sistema de control del trabajo realizado.

Cuando no ha podido realizarse relación alguna, se ha procedido a caracterizar pomológicamente el acebuche y crear una base de datos a comparar en un futuro con los bancos olivícolas de España.

Para finalizar, se establecerá en los próximos años un estudio mediante mapeo comparativo de movimiento del olivar, que permitirá en un futuro establecer un seguimiento de la filogenia de los olivastros o acebuches de manera conjunta con los cultivares en nuestras zonas de estudio.

## **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto 20170734. Desarrollo de métodos de cuantificación de biomasa en vegetación riparia para el manejo de cuencas en la Comunidad Valenciana. Dirección General de Universidades. Generalitat Valenciana. Valencia. España.

## Referencias

- Borges T.H., Pereira J.A., Cabrera-Vique C., Lara L., Oliveira A.F. & Seiquer I. 2017. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry*, 215: 454-462.
- Delgado, J.A. & Martínez, T. 2009. Acumulación de biomasa y carbono en zonas de bosque natural y restauradas en áreas de ribera. 5º Congreso forestal español. 2-9.
- González del Tánago M. 2010. Las riberas, elementos clave del paisaje y en la gestión del agua. 3-13.
- Risser, P.G. 1990. The ecological importance of land-water ecotones. En: R.J. Naiman & H. Décamps (eds.), *The Ecology and Management of Aquatic-Terrestrial Ecotones*, 7-21. *Man and the Biosphere Series*, Vol.4. UNESCO, París.
- Rood, S.B. & J.M. Mahoney. 1990. Abrupt downstream forest decline following river damming in southern Alberta. *Canadian Journal of Botany* 67: 1744-1749.
- Sterling, A. 1996. Los Sotos, refugio de vida Silvestre. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

## Tablas y Figuras

**Tabla 1-** Comparativa de alturas entre cv Serrana y olivastro Palancia ambos en las riberas del río Palancia.

Media individuos	Ht	Hb
cv Serrana	387,77	94,41
Olivastro Palancia	287,51	54,20

Siendo Ht altura total y Hb altura bifurcación (unidades en cm).

**Tabla 2-** Comparativa de diámetros entre troncos de cv Serrana y olivastro Palancia ambos en las riberas del río Palancia.

Media individuos	Diámetro 0	Diámetro 30	Diámetro 60	Diámetro 90	Diámetro final
cv Serrana	14,24	13,13	13,77	14,61	16,12
Olivastro Palancia	11,20	9,50	7,50	6,40	5,45

Unidades en cm

**Tabla 3-** Comparativa de diámetros de ramas principales (R1), secundarias (R2) y terciarias (R3) de cv Blanqueta y olivastro Turia ambos en zona ribera río Turia.

R1 n°	R1 Diámetro 0	R1 Diámetro 30	R1 Diámetro 60	R1 Diámetro 90
7,48	7,75	7,09	9,37	6,52
7,54	4,65	4,50	3,78	2,54
R2 n°	R2 Diámetro 0	R2 Diámetro 30	R2 Diámetro 60	R2 Diámetro 90
13,90	5,87	5,12	4,08	3,23
15,87	9,45	4,11	3,54	3,22
R3 n°	R3 Diámetro 0	R3 Diámetro 30	R3 Diámetro 60	
37	1,464227273	1,161818182	0,811227273	
49	0,54	0,21	0,11	

Unidades en cm, medidas tomadas desde la base de la rama y cada 30 cm hasta finalización.

## **Sessão II – Proteção da Oliveira**



## Os vetores potenciais de *Xylella fastidiosa* no olival alentejano e o papel da artropodofauna auxiliar na sua limitação natural

Ana Carina Neto<sup>1</sup>, Luís Gomes<sup>2</sup>, Maria Teresa Rebelo<sup>3</sup> & Fernando Trindade Rei<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande 1749-016 Lisboa, Portugal, acneto@fc.ul.pt

<sup>2</sup> ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Polo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, luispgomes@gmail.com; frei@uevora.pt

<sup>3</sup> Centro de Estudos do Ambiente e do Mar / Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande 1749-016 Lisboa, Portugal, mtrebelo@fc.ul.pt

### Resumo

A recente emergência da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al. associada ao Declínio Súbito do Olival em Itália, constitui uma grave ameaça à olivicultura. A existência de vetores capazes da sua transmissão, amplifica a dispersão da bactéria no olival, sendo o conhecimento e monitorização desses vetores vital para o desenvolvimento de estratégias para a contenção da doença. Desse modo, procedeu-se ao levantamento e identificação dos potenciais vetores da bactéria em olivais alentejanos, assim como de artrópodes auxiliares que possam contribuir para a sua limitação natural.

Selecionaram-se 126 locais, sem tratamentos químicos, na região do Alentejo, previamente dividida em 18 quadrículas de 30 × 30 km, onde se recolheram artrópodes entre 25 de outubro e 15 de novembro de 2016. Em cada local aspirou-se a copa de cinco oliveiras (10 s cada) e a vegetação espontânea circundante (50 s), quando presente.

Foram identificadas duas espécies de potenciais vetores, *Philaenus* sp. (5 indivíduos) e *Neophilaenus campestris* (Fällen) (20 indivíduos) nos dois tipos de hospedeiros vegetais, embora em maior abundância na vegetação espontânea. Globalmente, observou-se a mesma tendência para as vespas parasitóides (1,388 indivíduos), sendo as superfamílias Chalcidoidea, Ichneumonoidea e Cynipoidea as mais representadas. Em média, as aranhas estiveram igualmente presentes em ambos os tipos de hospedeiros, mas as formigas foram cerca de quatro vezes mais abundantes na vegetação espontânea, sendo estes os dois grupos de predadores mais representados.

A associação de *Philaenus* sp. e *N. campestris* à copa da oliveira, sob condições climáticas muito adversas, como as do Verão de 2016, confirma a existência de vetores capazes de transmitir e disseminar *X. fastidiosa* no Alentejo, caso a bactéria esteja presente, realçando a importância de ações dirigidas para a sua prevenção e deteção precoce. A presença de potenciais parasitóides e predadores sustenta a possibilidade dos potenciais vetores poderem ser alvo de limitação natural.

**Palavras-chave:** Aphrophoridae; *Philaenus* sp.; *Neophilaenus campestris*; parasitóides; predadores.

### Abstract

The recent emergence of the bacterium *Xylella fastidiosa* Wells et al. associated to Olive Quick Decline Syndrome in Italy constitutes a great threat to olive culture. Bacterium dispersal on olive groves is mainly driven by the presence of capable vectors which makes vectors' knowledge and monitoring crucial to the development of disease containment

strategies. As so, a survey of the potential vectors of the bacterium and beneficial arthropodofauna was performed on Alentejo olive groves.

Arthropod collection occurred from 25<sup>th</sup> October to 15<sup>th</sup> November 2016 on 126 olive groves lacking insecticide treatments spread over Alentejo region, previously divided onto 18 quadrats of 30 × 30 km. In each olive grove, five olive tree canopies (10 s each) were vacuum sampled as well as surrounding weeds (50 s), when present.

Two species of potential vectors were identified, *Philaenus* sp. (5 specimens) and *Neophilaenus campestris* (Fällen) (20 specimens), on both plant hosts, but with more prevalence on weeds. The same trend was observed for parasitoid wasps (1388 specimens), with Chalcidoidea, Ichneumonoidea and Cynipoidea being the most represented superfamilies. In mean, spiders were equally abundant on both plant hosts, but ants were about four times more abundant on weeds than on olive trees. Spiders and ants were the most represented groups of predators.

The association of *Philaenus* sp. and *N. campestris* to olive tree canopy, after extreme weather conditions, as the observed during Summer of 2016, confirms the presence of resilient vectors capable of *X. fastidiosa* transmission and establishment on Alentejo olive groves, if the bacterium is present. This highlights the importance of actions directed to *X. fastidiosa* prevention and early detection. The presence of parasitoids and predators sustains the possibility of natural control of potential vectors.

**Keywords:** Aphrophoridae; *Philaenus* sp.; *Neophilaenus campestris*; parasitoids; predators.

## Introdução

*Xylella fastidiosa* Wells et al. é uma bactéria fitopatogénica que coloniza os vasos xilémicos de centenas de plantas hospedeiras, sendo transmitida por insetos especialistas da seiva xilémica, pertencentes a algumas famílias e subfamílias de Auchenorrhyncha (Hemiptera) que, na Europa, incluem: Aphrophoridae, Cercopidae, Cicadidae e Cicadellinae (Redak et al., 2004; EFSA, 2015).

Doenças relacionadas com a bactéria afetam culturas importantes como a vinha (Doença de Pierce) ou os citrinos (Clorose Variegada dos Citrinos) no continente americano, há mais de um século (Hopkins & Purcell, 2002; Janse & Obradovic, 2010), mas a história desta bactéria noutras regiões, como Taiwan, Irão e alguns países europeus é mais recente.

O primeiro registo confirmado de *X. fastidiosa* na Europa deu-se em 2013 na Região de Apúlia, no Sul de Itália, onde a bactéria está associada ao Declínio Rápido do Olival (Saponari et al., 2013), tendo tido um impacto devastador na olivicultura da região, com a destruição de milhares de hectares de olival (Martelli et al. 2016). Desde a primeira deteção, novos focos associados a mais de uma subespécie da bactéria foram reportados em França, Espanha e Alemanha, o que sustenta a ocorrência de múltiplas introduções ao longo do tempo (Denancé et al., 2017).

Sendo considerada como um organismo de quarentena pela “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO) desde 1989, a introdução de *X. fastidiosa* em novas regiões é essencialmente uma consequência da intervenção humana, através do comércio e transporte de plantas e de mecanismos de controlo insuficientes ou ineficientes. A existência de plantas assintomáticas, o tempo necessário até ao aparecimento de sintomas visíveis e a possível confusão dos sintomas de doença com sintomas de stress hídrico ou de carências nutricionais são alguns fatores que dificultam a deteção da bactéria. Contudo, o estabelecimento de *X. fastidiosa* numa dada região depende da existência de um clima favorável, plantas hospedeiras suscetíveis e vetores

capazes. Na ausência de vetores capazes, a introdução de *X. fastidiosa* não representa um problema, uma vez que não é transmitida a novas plantas, ficando o seu efeito negativo limitado às plantas em que estava originalmente presente, aquando da introdução.

A posição privilegiada no comércio europeu e como destino turístico, o clima adequado, o vasto leque de plantas suscetíveis e as várias espécies de fitófagos do xilema, em Portugal, representam condições favoráveis à introdução e estabelecimento de *X. fastidiosa* (Pereira, 2015), sendo muito provavelmente uma questão de tempo até que esta bactéria se torne um problema real em território nacional.

A dinâmica das doenças provocadas por *X. fastidiosa* num determinado sistema é muito variável, estando extremamente dependente da combinação condições ambientais e da diversidade e ecologia da bactéria, das plantas e dos vetores presentes no sistema que necessitam de ser avaliadas localmente.

*Xylella fastidiosa* é um problema emergente na Europa onde a principal cultura afetada tem sido o olival que é também a cultura permanente mais relevante em Portugal (INE, 2017). A existência de vetores capazes é necessária para o estabelecimento da bactéria numa dada região e o conhecimento da diversidade e ecologia dos vetores potenciais é essencial ao desenvolvimento de estratégias de contenção adaptadas localmente. Assim, este trabalho teve como objetivos: conhecer os vetores potenciais da bactéria nos olivais alentejanos e avaliar a presença de artrópodes auxiliares com potencial na limitação natural dos vetores encontrados. Pretendeu-se ainda avaliar o efeito da planta hospedeira na abundância dos vetores potenciais encontrados e dos diferentes grupos de inimigos naturais.

## Material e Métodos

A amostragem de artrópodes decorreu entre 25 de outubro e 15 de novembro de 2016 com recurso a um aspirador Agricultural Backpack 2-Cycle Aspirator Model 1612 com um bucal de 12.7 cm de diâmetro com uma entrada de ar de 64 km/h, na região do Alentejo. Para se obter uma cobertura significativa da área de estudo, a região do Alentejo foi dividida numa grelha composta por 18 quadrantes de 900 km<sup>2</sup> e em cada quadrante foram selecionados 7 olivais livres de tratamentos com inseticidas, totalizando 126 locais de amostragem (fig. 1). Em cada local de amostragem, foram aspiradas 5 copas de oliveira (10 s cada) e, quando presente, a vegetação espontânea circundante (50 s).

As amostras foram preservadas num congelador até à sua triagem e identificação no Laboratório de Entomologia da FCUL. Um total de 156 amostras correspondentes a 117 locais de amostragem foram analisadas. Os artrópodes recolhidos foram triados até à ordem de acordo com Chinery (1988) e preservados em etanol (70%). Alguns grupos de predadores e parasitóides foram identificados a níveis taxonómicos inferiores. Os Coccinellidae foram identificados de acordo com Raimundo & Alves (1986) e os Formicidae e várias superfamílias de vespas parasitóides foram separadas dentro dos Hymenoptera de acordo com Goulet & Huber (1993).

Todos os Auchenorrhyncha foram identificados até à espécie, sempre que possível de acordo com Le Quesne (1969); della Giustina (1989); Holzinger et al. (2003); Zenner et al. (2005); Biedermann & Niedringhaus (2009); Gnezdilov et al. (2014); Wilson et al. (2015); e Fletcher et al. (2017). Quando a identificação da espécie não foi possível, foram definidas e consideradas morfoespécies.

Imagens da morfologia externa e da genitália masculina dos Auchenorrhyncha foram obtidas com recurso a um microscópio estereoscópico Zeiss SteREO Lumar V12 equipado com uma câmara industrial a cores The Imaging Source DFK 23U274 e escaladas no ImageJ versão 1.51j8.

A comunidade de Auchenorrhyncha adultos associada à copa das oliveiras e à vegetação espontânea foi caracterizada com base na abundância total, dominância e frequência de cada espécie. Os resultados para os grupos de inimigos naturais considerados foram sumarizados do mesmo modo.

O efeito do tipo de planta hospedeira na abundância média dos vetores potenciais e dos grupos de predadores e parasitóides encontrados foi avaliado através de modelos lineares generalizados (GLMs) com uma distribuição binomial negativa do erro e o logaritmo natural como função de ligação. Devido à sua reduzida abundância, não foram produzidos modelos para alguns grupos de predadores (Mantodea, Opiliones e Pseudoscorpiones). Nestes modelos, a variável dependente é a abundância do respetivo táxon e a variável independente é a planta hospedeira (“oliveira” ou “vegetação espontânea”) codificada numa variável *dummy*, com a “oliveira” como a categoria de referência. A significância do efeito da planta hospedeira na abundância média foi avaliada através de testes da razão de verossimilhança entre o modelo incluindo a planta hospedeira como variável explicativa e o modelo nulo (sem variáveis explicativas). Considerou-se 0.01 como o nível de significância estatística. A análise de dados foi realizada na plataforma de computação estatística R versão 3.4.1 (R Core Team, 2017). Os GLMs foram ajustados utilizando a função `glm.nb()` do pacote MASS (Venables & Ripley, 2002) e os testes de razão de verossimilhança foram aplicados através da função `lrtest()` do pacote lmerTest (Zeileis & Hothorn, 2002).

## Resultados e Discussão

Foram identificadas 45 espécies e morfoespécies de Auchenorrhyncha adultos (quadro 1) pertencentes a 6 famílias distintas (Aphrophoridae, Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Issidae, Tettigometridae). Apenas *Neophilaenus campestris* (Fallén) e *Philaenus* sp. (fig. 2) são especialistas da seiva xilémica, sendo por isso considerados como vetores potenciais de *X. fastidiosa* na área de estudo.

Não foi possível a determinação específica da espécie de *Philaenus* presente, dado que apenas foram recolhidas fêmeas e que a identificação específica deste género está dependente da preparação e observação da genitália masculina. A observação exclusiva de fêmeas está de acordo com a tendência de diminuição da proporção de machos em relação às fêmeas ao longo da época dos adultos, dado que as fêmeas permanecem para realizar a oviposição até mais tarde, uma vez que a época de amostragem coincide com o final da fase adulta (Yurtsever, 2000).

Considerando o limitado carácter temporal da prospeção realizada e a variabilidade na riqueza específica e abundância ao longo do ano e entre anos (Rei, 2006), outras espécies de vetores potenciais poderão ocorrer nos olivais alentejanos, questão que deverá ser estudada no futuro. Ainda assim, a ocorrência destas espécies representa um risco real de disseminação da bactéria no olival alentejano, em caso de introdução. No sul de Itália, foram encontradas várias espécies de vetores potenciais, incluindo *N. campestris* e *Philaenus spumarius* (Linnaeus), o vetor-chave na região (Cornara et al., 2016, 2017). Apesar de *N. campestris* conseguir adquirir a bactéria (Elbeaino et al. 2014, Saponari et al., 2014, Cornara et al., 2016), a sua capacidade de transmissão ainda se encontra por demonstrar, mas será apenas uma questão de amostragem insuficiente dado que a alimentação da seiva xilémica é o único fator limitante da capacidade de transmissão (Redak et al., 2004).

A reduzida abundância e diversidade de vetores potenciais encontrados pode ser parcialmente explicada pelo facto de o período de amostragem coincidir com o fim da época de ocorrência dos adultos (Yurtsever, 2000). As condições climáticas, com diversas

vagas de calor ocorridas durante o verão de 2016 (IPMA, 2016), que antecederam o período de amostragem, também terão tido certamente impacto na abundância e distribuição das espécies observadas.

Sendo a espécie com maior dominância na oliveira e a terceira espécie mais dominante na vegetação espontânea (quadro 1), *N. campestris* correspondeu a 80% dos vetores potenciais capturados. Esta tendência é oposta à observada nos olivais de Apúlia, onde *P. spumarius* é a espécie de vetor dominante, correspondente a mais de 90% das capturas (Cornara et al., 2016), mas possivelmente este resultado estará relacionado com limitações da amostragem.

Os vetores potenciais foram capturados em ambas as plantas hospedeiras (quadro 1). Em Apúlia, foi observada uma migração de *P. spumarius* da vegetação espontânea para as oliveiras em maio, período em que a vegetação espontânea começou a secar, e uma migração inversa no final de julho. Foi apenas após a migração dos adultos para a copa que surgiram os primeiros indivíduos infetados com *X. fastidiosa*, o que sugere que as oliveiras são a principal fonte de inóculo nos olivais italianos (Cornara et al., 2016). Tal como em Itália, poderão ocorrer dinâmicas migratórias sazonais entre as oliveiras e a vegetação espontânea no olival alentejano.

Em média, a abundância de vetores potenciais foi cerca de sete vezes superior na vegetação espontânea do que na oliveira, sendo o efeito da planta hospedeira na abundância dos vetores potenciais estatisticamente significativo (quadro 2). A abundância superior de vetores potenciais na vegetação espontânea é indicadora da sua importância como hospedeiro alternativo ou refúgio nos olivais e pode ser parcialmente explicada pela época de amostragem.

A abundância média dos grupos de inimigos naturais considerados foi superior na vegetação espontânea com a exceção dos Coccinellidae, Neuroptera e Aranea (quadro 2). As diferenças na abundância média entre plantas hospedeiras foram estatisticamente significativas para todos os grupos analisados exceto para os Platygastroidea e Aranea (quadro 2).

Foram capturados vários grupos de parasitóides e predadores na copa da oliveira e na vegetação espontânea. Globalmente, Chalcidoidea e Ichneumonoidea foram as superfamílias mais abundantes de parasitóides (quadro 3), correspondendo em conjunto a 90.85% dos parasitóides capturados. De entre as superfamílias de parasitóides encontradas, Chalcidoidea e Chrysidoidea incluem famílias conhecidas por parasitar Auchenorrhyncha. Os Chalcidoidea são essencialmente parasitóides de ovos, mas os Encyrtidae parasitam ninfas e adultos, incluindo de cigarrinhas-de-espuma (Waloff & Jervis, 1987), onde se inserem os vetores potenciais encontrados.

Foi encontrado um exemplar de *N. campestris* parasitado (fig. 2), mas não foi possível identificar o parasitóide além da ordem (Hymenoptera). Ainda assim, este caso de parasitoidismo mostra que existem relações de supressão natural que poderão ser exploradas para limitar as populações.

As aranhas constituíram o grupo de predadores mais abundante, sendo seguidas pelas formigas (quadro 3). A tendência inversa foi observada em olivais espanhóis onde as aranhas foram o grupo de predadores com a maior riqueza específica, mas o segundo grupo mais abundante, seguindo-se às formigas (Morris et al. 1999) e nas copas das oliveiras em olivais transmontanos (Santos et al. 2007). Esta diferença poderá ter-se devido ao período de amostragem e a diferenças nos métodos de amostragem utilizados.

Aranea e Formicidae foram também os predadores mais frequentes e dominantes nas amostras, sendo praticamente omnipresentes na vegetação espontânea com frequências superiores a 80% (quadro 3). Se as formigas foram cerca de quatro vezes mais

abundantes na vegetação espontânea, no caso das aranhas não se observaram diferenças significativas entre plantas hospedeiras.

É importante considerar que sendo as aranhas um grupo de predadores generalista, ao contrário de predadores especialistas, consomem um grande leque de tipos de presa, podendo afetar espécies não dominantes (Sunderland & Samu, 2000) e ter um papel na regulação das populações de vetores potenciais.

Nem todas as espécies de formigas são predadoras, mas são conhecidas diversas espécies predadoras (carnívoras e omnívoras) no olival alentejano como: *Tapinoma nigerrimum* Nylander, *Crematogaster scutellaris* (Olivier), *Pheidole pallidula* (Nylander) (Rei, 2006). Na América do Norte, *Formica montana* Wheeler tem um impacto significativo na redução das populações de *P. spumarius*. Do mesmo modo, algumas espécies de formigas presentes poderão ser uma força de supressão das populações dos vetores potenciais encontrados.

Ao contrário dos restantes grupos de inimigos naturais com diferenças significativas na abundância média entre hospedeiros, os Neuroptera foram o único grupo com maior abundância na copa das oliveiras do que na vegetação espontânea (quadro 2), onde apenas foram encontradas larvas. Os Chrysopidae foram a única família de Neuroptera encontrada, pertencendo praticamente todos os indivíduos à espécie *Chrysoperla carnea* (Stephens). Esta é também a espécie de crisopa dominante em olivais de Espanha e Itália (Corrales & Campos, 2004; Pantaleoni et al., 2001; Porcel et al., 2013).

Foram identificadas algumas espécies de Coccinellidae: *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia variegata* Goeze, *Rhyzobius litura* (Fabricius), *Scymnus interruptus* (Goeze), *Scymnus mediterraneus* Iablokoff-Khnzorian, *Stethorus punctillum* (Weise) e *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata* L., sendo a última a única espécie fitófaga entre as mencionadas e a penúltima a mais comum nas amostras. Dado que a predação por joaninhas está altamente dependente da relação do tamanho com as suas presas, que os vetores potenciais encontrados são maiores do que as joaninhas e que a maior parte das espécies identificadas se alimentam preferencialmente de afídeos e cochonilhas (Raimundo & Alves, 1986), a probabilidade de os Coccinellidae predarem os adultos dos vetores encontrados é altamente reduzida.

## Conclusões

A presença de vegetação espontânea no olival parece estar associada a maiores densidades de vetores potenciais de *X. fastidiosa*, pelo que poderá desempenhar um papel importante na manutenção das populações de vetores potenciais. Assim, olivais onde ocorre vegetação espontânea deverão estar mais suscetíveis ao estabelecimento de *X. fastidiosa*, em caso de introdução.

Foi encontrado um exemplar de *N. campestris* parasitado, fornecendo evidência da existência de relações de supressão natural que poderão ser exploradas num contexto de limitação natural das populações dos vetores.

A vegetação espontânea tem um contributo relevante na conservação do solo e um efeito positivo na densidade de predadores e parasitóides. Sendo a vegetação espontânea relevante para vetores potenciais de *X. fastidiosa* e inimigos naturais será importante identificar as espécies de fitófagos do xilema presentes noutras épocas do ano e determinar as plantas hospedeiras específicas às quais estão associados. Isto poderá fornecer informação sobre associações positivas e negativas entre espécies de plantas, vetores potenciais e inimigos naturais, com grande utilidade na gestão no coberto vegetal,

podendo ser favorecidas plantas menos atrativas para os vetores potenciais, utilizadas como refúgio por inimigos naturais.

### Referências

- Biedermann, R. & Niedringhaus, R. 2009. The plant- and leafhoppers of Germany: identification key to all species. WABV Fründ, Scheeßel.
- Chinery, M. 1988. Guía de campo de los insectos de España y de Europa. Omega, Barcelona.
- Cornara, D., Saponari, M., Zeilinger, A.R., de Stradis, A., Boscia, D., Loconsole, G., Bosco, D., Martelli, G.P., Almeida, R.P.P. & Porcelli, F. 2016. Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. *Journal of Pest Science* 90:521–530.
- Corrales, N. & Campos, M. 2004. Populations, longevity, mortality and fecundity of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae) from olive-orchards with different agricultural management systems. *Chemosphere* 57:1613-1619.
- della Giustina, W. 1989. Homoptères Cicadellidae. *Faune de France* 73, Vol. 3. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles + Institut National de La Recherche Agronomique, Paris.
- Dénancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., de Boissesson, C., Poliakoff, F. & Jacques, M.-A. 2017. Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology* 66:1054-1064.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2015. Scientific opinion on the risk plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of the risk reduction options. *EFSA Journal* 13:3989.
- Elbeaino, T., Yaseen, T., Valentini, F., Moussa, I.E.B., Mazzoni, V. & D'Onghia, M. 2014. Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53:328-332.
- Fletcher, M., Löcker, H., Mitchell, A. & Gopurenko, D. 2017. A revision of the genus *Orosius* Distant (Hemiptera: Cicadellidae) based on male genitalia and DNA barcoding. *Austral Entomology* 56:198-217.
- Gnezdilov, V.M., Holzinger, W.E. & Wilson, M.R. 2014. The western Palaearctic Issidae (Hemiptera, Fulgoroidea): an illustrated checklist and key to genera and subgenera. *Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences* 318, S1:1-118.
- Goulet, H. & Huber, J.T. 1993. Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Agriculture Canada, Ottawa.
- Holzinger, W.E., Kammerlander, I. & Nickel, H. 2003. Fulgoromorpha, Cicadomorpha, excl. Cicadellidae. *The Auchenorrhyncha of Central Europe*, Vol. 1. Brill, Leiden.
- Instituto Nacional de Estatística (INE). 2017. Estatísticas agrícolas 2016. INE, Lisboa.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). 2016. Boletim climatológico sazonal Verão 2016. IPMA, Lisboa.
- Le Quesne, W.J. 1969. Hemiptera: Cicadomorpha: Deltocephalinae. *Handbooks for the identification of British insects*, Vol. 2, Part 2(b). Royal Entomological Society of London, London.
- Martelli, G.P., Boscia, D., Porcelli, F. & Saponari, M. 2016. The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. *European Journal of Plant Pathology* 144:235-243.

- Morris, T.I., Campos, M., Kidd, N.A.C., Jervis, M.A. & Symondson, W.O.C. 1999. Dynamics of the predatory arthropod community in Spanish olive groves. *Agricultural and Forest Entomology* 1:219-228.
- Pantaleoni, R.A., Lentini, A. & Delrio, G. 2001. Lacewings in Northern Sardinian olive groves, p.435-446. In McEwen, P., New, T.R. & Whittington, A.E. (eds.), *Lacewings in the crop environment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pereira, P.S. 2015. *Xylella fastidiosa* - a new menace for Portuguese agriculture and forestry. *Revista de Ciências Agrárias* 38:149-154.
- Porcel, M., Ruano, F., Cotes, B., Peña, A. & Campos, M. 2013. Agricultural management systems affect the green lacewing community (Neuroptera: Chrysopidae) in olive orchards in Southern Spain. *Environmental Entomology* 42, 1:97-106.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing., Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Raimundo, A.A.C. & Alves, M.L. 1986. Revisão dos coccinelídeos de Portugal. Universidade de Évora, Évora.
- Rei, F.T. 2006. A artropodofauna associada ao olival no âmbito da protecção da cultura contra pragas. Tese de Doutoramento. Universidade de Évora, Évora.
- Santos, S.A.P., Pereira, J.A., Torres, L.M. & Nogueira, A.J.A. 2007. Evaluation of the effects, on canopy arthropods, of two agricultural management systems to control pests in olive groves from north-east of Portugal. *Chemosphere*, 67: 131-139
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R.K., de Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G.P., Krugner, R. & Porcelli, F. 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaneus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *Journal of Economic Entomology* 107:1316-1319.
- Sunderland, K. & Samu, F. 2000. Effects of agricultural diversification on the abundance, distribution, and pest control potential of spiders: a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95:1-13.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. 2002. *Modern applied statistics with S*. Springer, New York.
- Waloff, N. & Jervis, M.A. 1987. Communities of parasitoids associated with leafhoppers and planthoppers in Europe. *Advances in Ecological Research* 17:281-376.
- Wilson, M., Stewart, A., Biedermann, R., Nickel, H. & Niedringhaus, R. 2015. The planthoppers and leafhoppers of Britain and Ireland: identification keys to all families and genera and all British and Irish species not recorded from Germany. *Cicadina – Supplement*, Vol. 2. WABV Fründ, Scheeßel.
- Yurtsever, S. 2000. On the polymorphic meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* (L.) (Homoptera: Cercopidae). *Turkish Journal of Zoology* 24:447-459.
- Zeileis, A. & Hothorn, T. 2002. Diagnostic checking in regression relationships. *R News* 2:7-10.
- Zenner, G., Stöckmann, M. & Niedringhaus, R. 2005. Preliminary key to the nymphs of the families and subfamilies of the German Auchenorrhyncha fauna (Hemiptera, Fulgoromorpha et Cicadomorpha). *Beiträge zur Zikadenkunde* 8: 59-78.



## Quadros e Figuras

**Quadro 1** – Abundância total (N), dominância (D) e frequência (F) de Auchenorrhyncha adultos presentes em amostras de diferentes plantas hospedeiras (oliveira, n = 113; vegetação espontânea, n = 43) durante o outono de 2016 na região do Alentejo. Oli = copa de oliveira. Esp = vegetação espontânea. D = Proporção de indivíduos de uma dada espécie em relação ao número total de indivíduos de todas as espécies. F = Proporção de amostras em que uma dada espécie esteve presente em relação ao número total de amostras.

Família/ Espécie	N <sub>Oli</sub>	D <sub>Oli</sub> (%)	F <sub>Oli</sub> (%)	N <sub>Esp</sub>	D <sub>Esp</sub> (%)	F <sub>Esp</sub> (%)
APHROPHORIDAE						
<i>Neophilaenus campestris</i> (Fallén)	6	24.00	5.31	14	5.95	18.60
<i>Philaenus</i> sp.	1	4.00	0.88	4	1.70	9.30
CICADELLIDAE						
<i>Agallia</i> sp.	-	-	-	1	0.43	2.33
<i>Anaceratagallia laevis</i> (Ribaut)	-	-	-	9	3.82	11.63
<i>Anaceratagallia venosa</i> Fourcroy	1	4.00	0.88	-	-	-
<i>Austroagallia sinuata</i> (Mulsant & Rey)	-	-	-	3	1.27	4.65
<i>Euscelis lineolatus</i> Brullé	-	-	-	2	0.85	2.33
<i>Euscelidius variegatus</i> (Kirschbaum)	-	-	-	2	0.85	4.65
<i>Exitianus capicola</i> (Stål)	-	-	-	11	4.68	9.30
<i>Goniagnathus guttulinervis</i> (Kirschbaum)	-	-	-	3	1.28	6.98
<i>Macrosteles</i> sp.	-	-	-	1	0.43	2.33
<i>Orosius albicinctus</i> Distant	-	-	-	1	0.43	2.33
<i>Psammotettix</i> sp.	-	-	-	3	1.27	4.65
Deltocephalinae sp1	-	-	-	1	0.43	2.33
Deltocephalinae sp2	-	-	-	1	0.43	2.33
Deltocephalinae sp3	-	-	-	1	0.43	2.33
Deltocephalinae sp4	-	-	-	1	0.43	2.33
Deltocephalinae sp5	-	-	-	2	0.85	2.33
Deltocephalinae sp6	-	-	-	1	0.43	2.33
Deltocephalinae sp7	-	-	-	1	0.43	2.33
<i>Bugraia ocularis</i> (Mulsant & Rey)	1	4.00	0.88	-	-	-
<i>Arboridia parvula</i> (Boheman)	-	-	-	2	0.85	4.65
<i>Edwardsiana</i> sp.	-	-	-	1	0.43	2.33
<i>Empoasca decipiens</i> Paoli	1	4.00	0.88	-	-	-
<i>Empoasca solani</i> (Curtis)	-	-	-	3	1.27	4.65
<i>Fruticidia bisignata</i> (Mulsant & Rey)	1	4.00	0.88	-	-	-
<i>Zygina nivea</i> (Mulsant & Rey)	2	8.00	0.88	1	0.43	2.33
<i>Zygina ordinaria</i> (Ribaut)	1	4.00	0.88	6	2.55	4.65
<i>Zyginidia scutellaris</i> (Herrich-Schäffer)	1	4.00	0.88	106	45.10	30.23
Typhlocybinae sp1	-	-	-	3	1.27	4.65
Typhlocybinae sp2	2	8.00	1.77	5	2.12	4.65
Typhlocybinae sp3	-	-	-	1	0.43	2.33
Typhlocybinae sp4	2	8.00	1.77	1	0.43	2.33
Typhlocybinae sp5	-	-	-	1	0.43	2.33
Typhlocybinae sp6	-	-	-	1	0.43	2.33
Typhlocybinae sp7	-	-	-	1	0.43	2.33
Typhlocybinae sp8	-	-	-	1	0.43	2.33
CIXIIDAE						
<i>Tachycixius pilosus</i> (Olivier)	1	4.00	0.88	-	-	-
DELPHACIDAE						
<i>Laodelphax striatella</i> (Fallén)	-	-	-	2	0.85	4.65
<i>Metadelphax propinqua</i> (Fieber)	1	4.00	0.88	35	14.89	30.23
ISSIDAE						
<i>Fieberium impressum</i> (Fieber)	1	4.00	0.88	2	0.85	2.33
<i>Tingissus guadarramense</i> (Melichar)	1	4.00	0.88	-	-	-
Issidae sp1	1	4.00	0.88	-	-	-
TETTIGOMETRIDAE						
<i>Tettigometra virescens</i> (Panzer)	1	4.00	0.88	-	-	-
<i>Tettigometra obliqua</i> Panzer	-	-	-	1	0.43	2.33

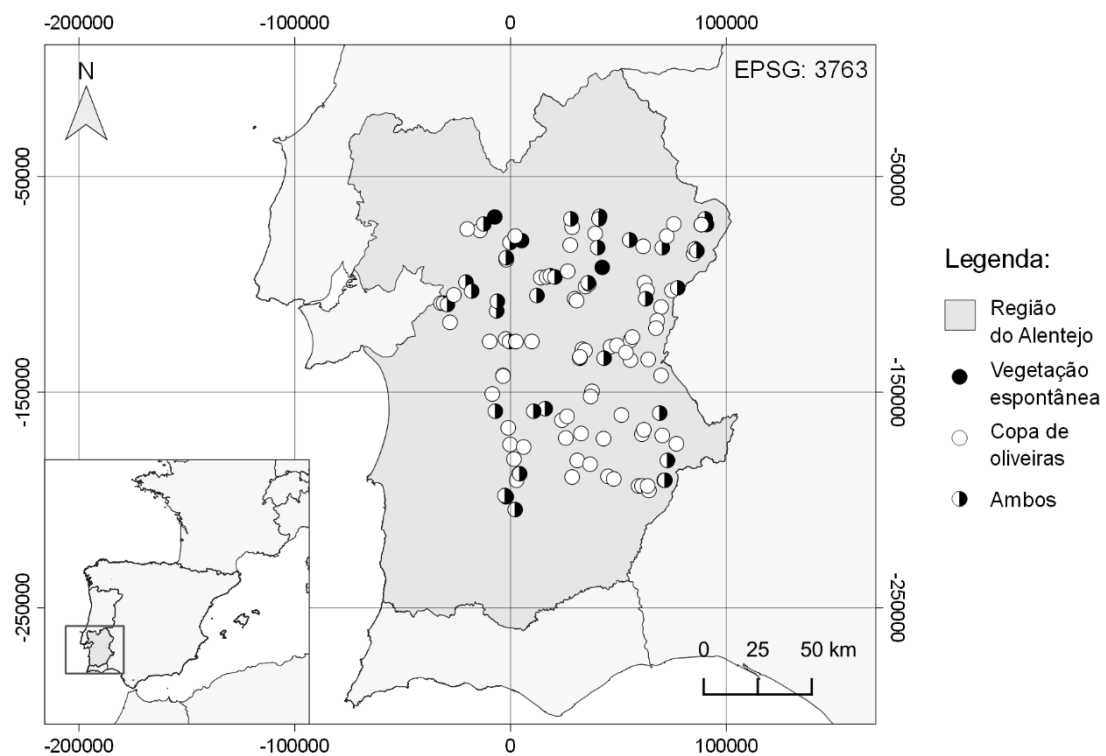
**Quadro 2** – Modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição binomial negativa do erro e logaritmo natural como função de ligação para avaliação de diferenças na abundância média de vetores potenciais de *X. fastidiosa*, predadores e parasitóides (variáveis resposta) entre plantas hospedeiras (variável explicativa). Significância das diferenças avaliada através de testes de razão da máxima verossimilhança entre modelos nulos e com a planta hospedeira como variável explicativa. Diferenças significativas ( $\alpha = 0.01$ ) assinaladas a negrito. Oli = copa de oliveira. Esp = vegetação espontânea.

Variável dependente	Planta hospedeira		Teste de razão de verossimilhança	
	Oli (média $\pm$ erro-padrão)	Esp (média $\pm$ erro-padrão)	RV	P
Aphrophoridae	0.06 $\pm$ 0.023	0.42 $\pm$ 0.146	11.52	<b>0.0007</b>
Coccinellidae	0.42 $\pm$ 0.095	0.23 $\pm$ 0.080	1.59	0.2075
Formicidae	3.65 $\pm$ 0.598	14.05 $\pm$ 2.981	29.57	<b>&lt; 0.0001</b>
Neuroptera	0.63 $\pm$ 0.115	0.09 $\pm$ 0.065	14.87	<b>0.0001</b>
Aranea	11.91 $\pm$ 1.1239	11.47 $\pm$ 1.387	0.05	0.8162
Chalcidoidea	3.10 $\pm$ 0.466	9.86 $\pm$ 1.711	35.70	<b>&lt; 0.0001</b>
Chrysidoidea	0.03 $\pm$ 0.015	0.19 $\pm$ 0.076	7.56	<b>0.0060</b>
Cynipoidea	0.12 $\pm$ 0.042	1.72 $\pm$ 0.495	31.16	<b>&lt; 0.0001</b>
Ichneumonoidea	1.12 $\pm$ 0.163	8.37 $\pm$ 1.409	70.35	<b>&lt; 0.0001</b>
Platyastroidea	0.11 $\pm$ 0.032	0.37 $\pm$ 0.200	4.18	0.0394

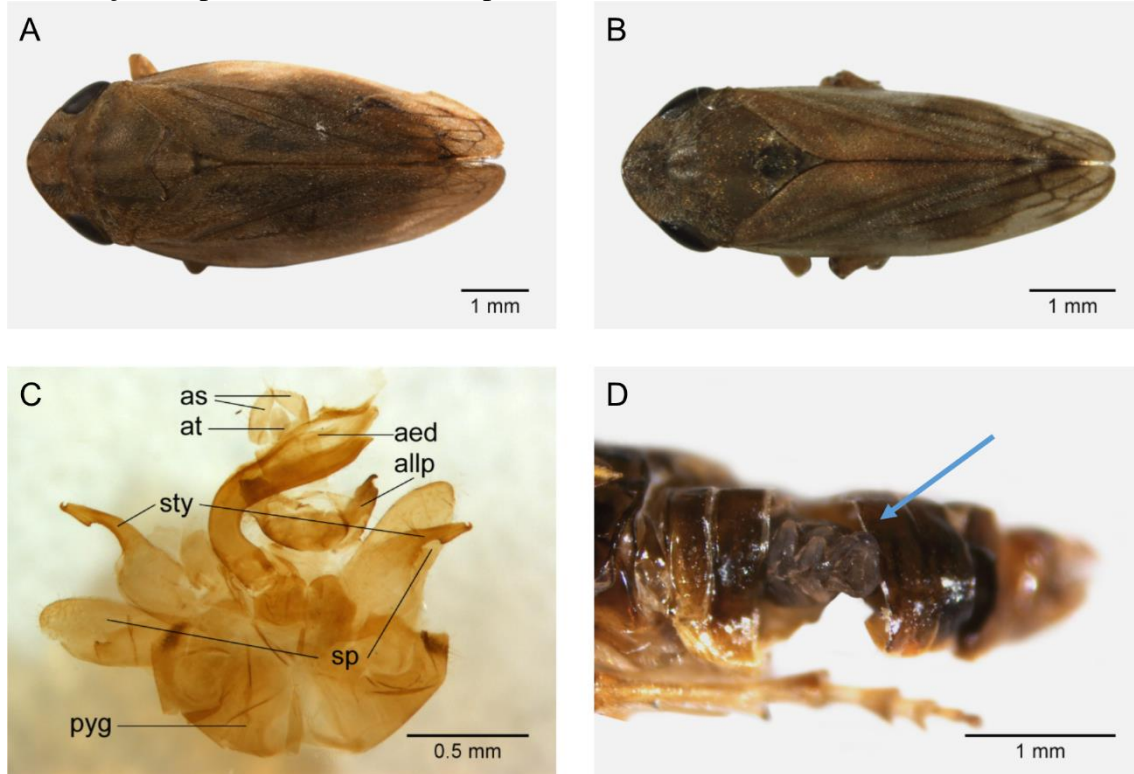
**Quadro 3** – Abundância total (N), dominância (D) e frequência (F) de inimigos naturais presentes em amostras de diferentes plantas hospedeiras (oliveira, n = 113; vegetação espontânea, n = 43) durante o outono de 2016 na região do Alentejo. Oli = copa de oliveira. Esp = vegetação espontânea. D = Proporção de indivíduos de um dado táxon em relação ao número total de indivíduos de todos os taxa. F = Proporção de amostras em que um dado táxon esteve presente em relação ao número total de amostras.

Guilda	Taxa	N <sub>Oli</sub>	D <sub>Oli</sub> (%)	F <sub>Oli</sub> (%)	N <sub>Esp</sub>	D <sub>Esp</sub> (%)	F <sub>Esp</sub> (%)
Predadores	Coccinellidae	47	2.50	23.01	10	0.87	18.60
	Formicidae	412	21.94	68.14	604	52.75	81.40
	Neuroptera	71	3.78	37.17	4	0.35	4.65
	Mantodea	-	-	-	1	0.09	2.33
	Aranea	1,346	71.67	96.46	493	43.06	97.67
	Opiliones	2	0.11	1.77	-	-	-
	Pseudoscorpiones	-	-	-	33	2.88	18.60
Parasitóides	Chalcidoidea	350	69.17	76.99	424	48.07	97.67
	Chrysidoidea	3	0.59	2.65	8	0.91	13.95
	Cynipoidea	14	2.77	8.85	74	8.39	46.51
	Ichneumonoidea	127	25.10	57.52	360	40.82	83.72
	Platyastroidea	12	2.37	9.73	16	1.81	11.63

**Figura 1** - Mapa área de estudo com a distribuição dos locais de amostragem e as plantas hospedeiras amostradas em cada local.



**Figura 2** – Espécies de vetores potenciais. A – Morfologia geral externa de *Philaenus* sp. (vista dorsal). B – Morfologia geral externa de *Neophilaenus campestris* (Fallén). C – Genitália masculina de *N. campestris* (aed – edeago; allp – apêndice do lobo lateral do pigóforo; as – estilo anal; at – tubo anal; pyg – pigóforo; sp – placa subgenital; sty – estilo). D – Caso de parasitoidismo observado em *N. campestris*. A seta azul indica a localização do parasitóide no seu hospedeiro.



## **Avaliação do potencial antimicrobiano de endófitos de oliveira para uso como agentes de controlo biológico de *Xylella fastidiosa***

Ana Rita Varela<sup>1</sup>, Camila Fernandes<sup>1,2,3</sup>, Teresa Barradas<sup>1</sup>, António Cordeiro<sup>1</sup>, Rocío Arias-Calderón<sup>1</sup>, Regina Menino<sup>1</sup>, Amélia Castelo Branco<sup>1</sup>, Luís Fernandes<sup>1</sup>, Paula Sá-Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras Portugal; <sup>2</sup>Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Laboratório Associado, Universidade do Porto, Vairão, Portugal; <sup>3</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal. paula.sapereira@iniav.pt

### **Resumo**

*Xylella fastidiosa* Wells et al. é uma bactéria de quarentena que afeta um vastíssimo número de hospedeiros vegetais, incluindo a oliveira (*Olea europaea* L.). Desde 2013 que está presente na Europa, com um primeiro surto em Apúlia (Itália), tendo sido diagnosticada a sua presença, desde então, em França (2015), na Alemanha (2016) e em Espanha (2016 e 2017).

A transmissão de *X. fastidiosa* é feita por insetos polípagos, picadores-sugadores de fluido xilémico. A progressão da doença na planta depende da capacidade da bactéria se deslocar desde o ponto de inoculação e de desenvolver um biofilme no xilema, bloqueando o acesso de água, sais minerais e nutrientes às zonas mais apicais da planta. O desenvolvimento de sintomas depende de vários fatores como a espécie afetada, o estado fisiológico da planta e a interação com microrganismos que colonizam o xilema, os endófitos e fatores abióticos.

A presença de uma comunidade de microrganismos endófitos é uma característica dos tecidos das plantas saudáveis, estabelecendo-se entre ambas relações, geralmente simbióticas mutualistas, contribuindo, por exemplo, para maior resistência da planta a stresses bióticos. A comunidade endofítica é uma fonte promissora de soluções para a protecção das plantas em produção. Não obstante, a existência de estudos exploratórios dedicados à caracterização da composição das comunidades endofíticas em diversas variedades de oliveira e o respetivo potencial para aplicações em controlo biológico de *X. fastidiosa* permanece relativamente inexplorado.

Este estudo tem como objetivo principal caracterizar a composição e estrutura da comunidade endofítica de variedades Portuguesas de oliveiras, economicamente importantes, como a Cobrançosa, a Galega Vulgar, a Arbequina e a Cordovil de Serpa, com vista a obter isolados que apresentem potencial bactericida e/ou bacteriostático contra *X. fastidiosa*.

O isolamento e caracterização dos endófitos das quatro variedades de oliveira evidenciaram diferenças na presença e prevalência de endófitos entre diferentes variedades de oliveira e entre diferentes tecidos na mesma variedade.

Os isolados com potencial biocida contra a *X. fastidiosa* serão estudados com vista a integrarem estratégias sustentáveis de biocontrolo.

**Palavras-chave:** Biocontrolo, endófitos, *Olea europaea* L., *Xylella fastidiosa*.

**Abstract**

*Xylella fastidiosa* Wells et al. is a bacterial plant pathogen infecting a broad host range in which the olive tree (*Olea europaea* L.) is included. While previously confined to the American continent, since 2013 it can also be found in Europe where it was firstly associated to an outbreak in Apulia. Its presence has since been confirmed in France (2015), Germany (2016) and Spain (2016 and 2017).

Transmission of *X. fastidiosa* is carried among plants via polyphagous xylem-feeding insects. Disease progression depends on the bacteria's ability to move from the inoculation point and to constitute biofilm structures inside the xylem vessels, blocking the flow of nutrients and water to the upper parts of the plant. Symptom development depends upon factors such as the plant species, the plants' physiological status, the interaction of the bacteria with other microorganisms which inhabit the xylem - the endophytes - and abiotic factors. The existence of an endophytic community is characteristic of the tissues of a healthy plant, with which these microorganisms establish usually a mutualist relationship, contributing for example for the hosts' increased resistance to biotic stresses. Endophytic communities are a promising source of solutions for plant protection. Despite the existence of exploratory studies characterizing the composition of the endophytic community in several olive varieties, its potential for applications in biological control remains quite unexplored.

This study main objective is to characterize the endophytic community in *Olea europaea* Portuguese varieties of economic relevance such as Cobrançosa, Galega Vulgar, Arbequina e Cordovil de Serpa, with the aim of obtaining isolates with biocidal properties towards *X. fastidiosa*.

Preliminary isolation trials from the four olive tree varieties have revealed differences in the presence and prevalence of endophytic microorganisms among olive tree cultivars and among plant tissues in the same cultivar.

The obtained isolates, as well as relevant mechanisms and substances, will be evaluated for their biocidal potential towards *X. fastidiosa* in order to incorporate sustainable protection strategies.

**Keywords:** Biocontrol, endophytes, *Olea europaea* L., *Xylella fastidiosa*.

**Introdução**

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, classificada como organismo de quarentena, que afeta mais de 300 espécies agrícolas, florestais e ornamentais (Hopkins e Purcell, 2002; EPPO, 2016). Está presente na Europa desde 2013, onde foi detectada no sul da Itália, na região de Apúlia, associada a um surto que dizimou centenas de hectares de produção de oliveira (EFSA, 2015). Encontra-se atualmente na Alemanha, em França e Espanha, constituindo um risco iminente para a olivicultura e para muitas outras culturas em Portugal (DGAV Ofício circular N.º 12/2018, 2018).

Esta bactéria é disseminada através de insetos-vetor picadores-sugadores de fluido xilémico, sendo associada ao *Philaenus spumarius* a maior taxa de disseminação da infeção na Europa (EFSA, 2015). O desenvolvimento da bactéria dentro dos vasos xilémicos resulta na formação de biofilmes que progressivamente bloqueiam o fluxo de nutrientes e água para a parte apical das plantas. A sintomatologia da infeção está associada ao aparecimento de queimaduras nos vértices foliares dos ramos apicais, ramos secos, e na morte da planta da zona apical para a raiz, o “dieback” (Janse and Obradovic, 2010). O controlo da qualidade do material para plantação e dos insetos vetores é determinante para prevenir surtos desta bactéria. Após o diagnóstico da infeção, é

obrigatório o arranque da planta e destruição de todo o material infetado, não existindo ainda um tratamento que permita curar e preservar as plantas infetadas. O controlo dos insetos-vetor implica a utilização de práticas culturais que desequilibram os ecossistemas, como a mobilização do solo nas entrelinhas, assim como a utilização massiva de inseticidas, que não só afeta os insetos-vetor como os auxiliares. O impacto ambiental, económico e social associado a *X. fastidiosa* é muito significativo sendo urgente o desenvolvimento de alternativas de controlo de aplicação simples, rápidas, ambientalmente e financeiramente sustentáveis.

Por toda a Europa, estão a ser envidados esforços no sentido de identificar quais as variedades de oliveira resistentes/tolerantes à infecção (Baù *et al.*, 2017, Giampetruzzi *et al.*, 2016; Morelli *et al.*, 2017) e os factores que determinam essa resistência/tolerância como forma de controlar a disseminação de *X. fastidiosa* no território.

A dinâmica do patossistema, e, especificamente, a interação entre hospedeiros e comunidade endofítica tem sido alvo de acrescida atenção, já que demonstra estar intimamente ligada com a resposta da planta ao stresse (Mitter *et al.*, 2013; Brader *et al.*, 2014). A interação endófito-hospedeiro pode beneficiar a planta através de diversos mecanismos directos e indirectos, incluindo, por exemplo, a produção de metabolitos que protegem a planta contra microrganismos patogénicos ou a estimulação da resistência da planta à infecção (Brader *et al.*, 2014, Mitter *et al.*, 2013). Estudos preliminares demonstraram que existem microrganismos endófitos em oliveira com capacidade para produzir metabolitos com propriedades antagonistas contra bactérias e fungos (Aranda *et al.*, 2011; Landum *et al.*, 2016; Malhadas *et al.*, 2017). Num estudo com plantas do género *Citrus*, onde a infecção por *X. fastidiosa* se designa por Clorose Variegada dos Citrinos (CVC), foi proposta a existência de uma correlação entre a presença do endófito *Curtobacterium flaccumfaciens*, e o desenvolvimento de sintomas da doença. Os autores verificaram uma maior frequência de isolamento de *C. flaccumfaciens* a partir de plantas assintomáticas, em comparação com outros endófitos presentes (Araújo *et al.*, 2002). Posteriormente, a interacção entre *C. flaccumfaciens* e *X. fastidiosa* foi demonstrada por ensaios de patogenicidade, por Lacava *et al.*, (2007), que observou que a inoculação com o endófito reduz a severidade dos sintomas associados à infecção por *X. fastidiosa* em *Catharanthus roseus*.

Nesse sentido, e dada a escassez de informação sobre a comunidade endofítica em oliveira, o objectivo principal deste estudo foi fazer uma avaliação preliminar da composição qualitativa e quantitativa da mesma. Para o efeito, foram seleccionadas quatro variedades de oliveira economicamente relevantes em Portugal - Cobrançosa, Galega Vulgar, Arbequina e Cordovil de Serpa - onde foi feito o isolamento de endófitos cultiváveis (bactérias e fungos), com vista a obter isolados com potencial antimicrobiano contra *X. fastidiosa*. O conhecimento das diferenças quantitativas e qualitativas entre as comunidades endofíticas de variedades de oliveira permitirá estudos de correlação entre a composição da comunidade endofítica e i) o perfil bioquímico do fluido xilémico, ii) a resistência à infecção e ao desenvolvimento de sintomas associados a *X. fastidiosa* em oliveira.

## Material e Métodos

Amostras de caules e folhas (pecíolos e nervuras principais) foram obtidas a partir de plantas com dois anos envasadas em substrato Siroлива, das variedades Arbequina, Cobrançosa, Cordovil de Serpa e Galega Vulgar (três plantas/variedade) obtidas a partir da Coleção Portuguesa de Referência de Cultivares de *Oliveira*. CPRCO, INIAV, Elvas.

O processamento do material vegetal foi feito em condições assépticas. Foram escolhidos aleatoriamente 2 ramos de cada planta e separados em folhas e caules, totalizando 6 fragmentos de caules e 60 folhas por variedade. As amostras foram lavadas e desinfetadas, para remoção de contaminantes superficiais e comunidades epifíticas. O material vegetal foi acondicionado em sacos de extracção Bioreba, macerado num homogeneizador Homex (Bioreba, Switzerland), com PBS 1x (10 mL PBX 1x/g peso fresco). Do filtrado (extrato total) foram preparadas diluições seriadas do extrato *per se* e de extrato centrifugado - pellet (20 000g, 4°C, 10 min), que foi ressuspensão em 3,5 mL PBS 1x. O extrato total e o pellet foram diluídos a 1:10 e 1:100 em NaCl 0,85% e inoculados por esgotamento (alíquotas de 100  $\mu$ L e 50  $\mu$ L) em R2A (Oxoid), YEA (Biokar) e PWG (Davis *et al.*, 1983). Adicionalmente, uma alíquota de 500  $\mu$ L do pellet foi inoculada em 15 mL de NB (Oxoid), para enriquecimento da população endofítica cultivável, e incubada a 30°C e a 100 rpm, durante 6 dias, após os quais a suspensão resultante foi homogeneizada e inoculada por esgotamento (100  $\mu$ L) em R2A, YEA e PWG. Para controlo da desinfeção superficial, uma alíquota (100  $\mu$ L) de água da segunda lavagem foi cultivada por esgotamento nos mesmos meios de cultura utilizados para o isolamento de potenciais endófitos. As placas foram incubadas a 24 °C, durante 11 dias, tempo durante o qual foram, diariamente, observadas e registado o crescimento de endófitos, sendo as colónias caracterizadas quanto à sua morfologia (cor, diâmetro, textura, opacidade, relevo, margem), por observação à lupa (10x). No final deste período, colónias representantes dos diferentes morfotipos foram transferidas para YEA para obtenção de cultura axénica. A presença dos morfotipos identificados foi analisada qualitativa e quantitativamente de modo a se poder estabelecer relações comparativas entre variedades de oliveira e tecidos vegetais de origem (caules ou folhas).

## Resultados e Discussão

Do processo de isolamento de endófitos a partir de cultivares de oliveira - Arbequina, Cobrançosa, Cordovil de Serpa e Galega Vulgar - foi possível obter um total de 33 morfotipos distintos, compreendendo proporções semelhantes de fungos (F) (17/33, 52%) e bactérias (B) (16/33, 48%). A abundância de cada morfotipo e a diversidade da comunidade endofítica serviram de base para a comparação entre variedades de oliveira e tecidos vegetais de origem.

### Abundância

Os morfotipos mais abundantes foram: B50 ( $2,5 \times 10^5$  UFC/g peso fresco<sup>-1</sup>), identificado em caules da variedade Cobrançosa; F27 ( $1,0 \times 10^4$  UFC/g peso fresco<sup>-1</sup>), identificado em caules da variedade Galega; e F23 ( $5,4 \times 10^3$  UFC/g peso fresco<sup>-1</sup>), identificado em folhas da variedade Cobrançosa (Tabela 1). Apesar da sua abundância, os representantes destes morfotipos não mostraram ser ubíquos, sendo recuperados apenas de duas (B50) ou uma (F27 e F23) variedade, o que sugere que a sua abundância está relacionada com características próprias de cada variedade, que lhe proporciona um ambiente favorável ao desenvolvimento, e não com a capacidade destes endófitos de colonizar diversos ambientes.

Os morfotipos B61, B31 e F54, por outro lado, foram os menos frequentes, tendo sido contabilizados na ordem dos  $1,0 \times 10^1$ ,  $1,5 \times 10^1$  e  $1,6 \times 10^1$  UFC/g peso fresco<sup>-1</sup>, em caules das variedades Cobrançosa, Arbequina e Galega, respetivamente. Os representantes destes morfotipos, além de pouco abundantes, mostraram ser específicos do tecido e variedade de onde foram recuperados (Tabela 1).



### Diversidade entre variedades de *Olea europaea*

Cerca de 58% (19/33) dos morfotipos puderam ser obtidos das quatro variedades de oliveira, o que sugere que uma parte considerável da comunidade endofítica é comum às várias variedades. A variedade Galega Vulgar apresentou a maior diversidade, já que foi possível isolar um total de 19 morfotipos diferentes dos respectivos tecidos (Tabela 1). Em contraste, a variedade Cordovil de Serpa foi a que mostrou albergar menos diversidade de endófitos cultiváveis, totalizando 11 morfotipos diferentes (Tabela 1).

Os morfotipos mais ubíquos foram o F19, F20 e F32, correspondentes a fungos, que foram isolados de todas as variedades em estudo e de todos os tecidos. Por outro lado, 48% (16/33) dos morfotipos só puderam ser isolados de uma variedade (Tabela 1).

Estes dados sugerem que existe uma variação na composição das comunidades endofíticas de cultivares de oliveira de diferentes variedades, existindo também um número considerável de espécies exclusivas de cada variedade.

### Diversidade entre tecidos

A variação da diversidade de morfotipos entre tecidos foi também analisada. Como regra geral, observou-se que a um aumento da diversidade obtida de cada variedade estava associada uma menor quantidade de morfotipos comuns entre os tecidos da mesma variedade (Tabela 2). A variedade Galega Vulgar mostrou a maior disparidade entre tecidos, já que apenas um morfotipo (F32), correspondendo a 5% (1/19) do total isolado desta variedade, foi encontrado em comum entre caules e folhas. Na variedade Cordovil de Serpa, ao contrário do que foi observado em Galega Vulgar, 30% (4) dos morfotipos isolados foram encontrados em ambos os tecidos amostrados.

Verificou-se adicionalmente que 36% (12/33) dos morfotipos identificados, incluindo B8, B10, B11, B31, B48, B56, B61, F27, F28, F30, F54 e F63, só foram encontrados em caules, enquanto 18% (6/33), incluindo B43, B44, B47, F39, F40 e F64, só foram isolados de folhas o que indica a existência de especificidade destas espécies em relação ao tecido vegetal (Tabela 1).

Observou-se também que o número de morfotipos bacterianos recuperados a partir de caules foi sempre superior ao que pode ser recuperado de folhas em todas as variedades excepto em Galega Vulgar (Figura 1). Adicionalmente, foi possível observar a existência de cinco morfotipos (F19, F20, F22, B48 e B55) em comum entre os caules de Cobrançosa, Arbequina e Galega Vulgar, uma quantidade maior do que se observou entre diferentes tecidos em cada uma destas variedades (Tabela 1). Este dado sugere que a natureza do tecido vegetal tem um papel a desempenhar na composição da comunidade endofítica residente, que deverá ser tido em conta na prospecção de endófitos com propriedades antimicrobianas.

### **Conclusões**

Demonstrou-se a existência de diferenças na composição qualitativa e quantitativa da comunidade endofítica cultivável de oliveiras de diferentes variedades. Demonstrou-se, adicionalmente, que a comunidade endofítica difere conforme o tecido vegetal de que é originária (caules ou folhas), sendo por vezes possível encontrar mais similaridade entre as comunidades que colonizam caules de diferentes variedades do que entre as comunidades que colonizam tecidos diferentes na mesma variedade. Tendo sido demonstrado que diferentes variedades de oliveira têm diferentes níveis de resistência à progressão da colonização por *X. fastidiosa* (Luvisi *et al.*, 2017), estes resultados podem sugerir que as diferenças na resistência à infecção podem ser em parte devidas à variação da comunidade endofítica. Por outro lado, em ensaios com péptidos sintéticos foi

demonstrado que o crescimento da *X. fastidiosa* é claramente condicionado, demonstrando a importância da composição dos tecidos a partir dos quais se preparam os extratos vegetais (Sá-Pereira, 2017).

Os isolados selecionados com base na sua prevalência, identificação molecular, propriedades biocidas, previamente descritas na literatura, e características de crescimento *in vitro*, serão considerados candidatos a testes de antagonismo contra *X. fastidiosa*.

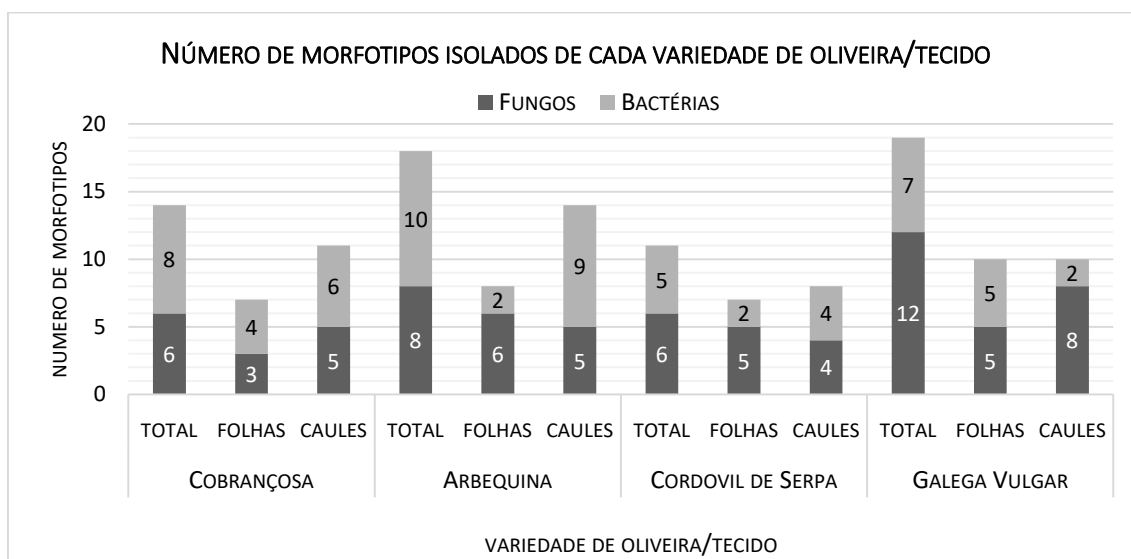
Tendo em conta o estado do conhecimento actual sobre a influência da comunidade endofítica na resistência dos hospedeiros a processos de infecção e ao desenvolvimento de sintomas, é fundamental identificar qual/quais os candidatos a agentes de biocontrolo e qual a composição dos tecidos de onde são isolados. A identificação dos isolados por métodos biomoleculares está em curso assim como estão a ser analisados os efeitos da variação do substrato na comunidade endofítica das variedades em estudo e na composição dos tecidos e fluido xilémico. O objetivo será a utilização de estratégias de correção biológica e química do solo para influenciar a composição qualitativa e quantitativa da comunidade endofítica e, consequentemente, aumentar a resistência das plantas à infecção por *X. fastidiosa*.

## Referências

- Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M. e Landa, B. B. (2011) 'Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*', *Plant and Soil*, 343(1–2):329–345.
- Araújo, W., Marcon, J., Maccheroni, W., Van Elsas, J., Van Vuurde, J., Azevedo, J. (2002) 'Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4906–4914.
- Baù, A., Delbianco, A., Stancanelli, G. e Tramontini, S. (2017) Susceptibility of *Olea europaea* L. varieties to *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53: systematic literature search up to 24 March 2017. *EFSA Journal*, 15(4 (4772)):1–18.
- Boscia D., Saponari M., Palmisano F., Loconsole G., Martelli G.P., Savino V.N. (2014) Field observations on the behaviour of different olive cultivars in response to *Xylella fastidiosa* infections. *International Symposium on the European Outbreak of Xylella fastidiosa in Olive. Journal of Plant Pathology*.96:S4:107.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. e Sessitsch, A. (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27:30–37.
- Davis, M. J., Raju, B. C., Brlansky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W., Norris, R. C. e McCoy, R. E. (1983) 'Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathology*, 73(11):1510–1515.
- DGAV Ofício circular N.º 12/2018. Focos *Xylella fastidiosa* em Espanha – 1ª deteção na região de Madrid.
- EFSA. (2015) Scientific opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal*, 13(1 (3989)):1–261.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization (2016) EPPO A1 And A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. PM 1/2(25) English
- Giampetruzzi A., Morelli M., Saponari M., Loconsole G., Chiumenti M., Boscia D., Savino V., Martelli G.P. e Saldarelli P. (2016). Transcriptome profiling of two olive

- cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *BMC Genomics* 17:475.
- Hopkins, D. L. e Purcell, A. H. (2002) *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86(10):1056–1066.
- Janse, J. D. and Obradovic, A. (2010) *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology* 92(2): 417–421.
- Lacava, P. T., Li, W., Araújo, W. L., Azevedo, J. L. e Hartung, J. S. (2007) The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*., *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea) 45(5): 388–393.
- Landum, M. C., Félix, M. do R., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M. J., Rei, F. e Varanda, C. M. R. (2016) Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research* 183:100–108.
- Luvisi, A., Aprile, A., Sabella, E., Vergine, M. Nicoli, F., Nutricati, E. Miceli, A., Negro, C., deBellis, L. (2017) '*Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (CoDiRO strain) infection in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars: profile of phenolic compounds in leaves and progression of leaf scorch symptoms', *Phytopathologia Mediterranea*, 56(2): 241–252.
- Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J. A., Guedes de Pinho, P. e Baptista, P. 2017. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:46 .
- Mitter, B., Brader, G., Afzal, M., Compant, S., Naveed, M., Trognitz, F. e Sessitsch, A. (2013) Chapter Seven - Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria. p. 381-445. In: Sparks, D (ed), *Advances in Agronomy*. Vol. 121. Academic Press/Elsevier, San Diego
- Morelli, M., Giampetruzzi, A., D'Attoma, G., Saponari, M., Nigro, F. e Saldarelli, P. (2017) The endophytic microbiome of *X. fastidiosa* susceptible and resistant olives. *Proceedings of the European conference on Xylella fastidiosa: finding answers to a global problem*. Palma de Mallorca. Spain, 13-15 November 2017:48.
- Sá-Pereira P., Machado H., Fernandes C., Teixeira C., Gomes P. (2017) Characterization of synthetic peptides bioactivity on *X. fastidiosa* growth profile and biofilm disaggregation. *Proceedings of the European conference on Xylella fastidiosa: finding answers to a global problem*. Palma de Mallorca. Spain, 13-15 November 2017:49.

## Tabelas e Figuras



**Figura 1** – Distribuição dos morfotipos isolados pelas variedades de oliveira e respetivos tecidos analisados

**Tabela 1** – Distribuição dos morfotipos isolados de cada variedade de oliveira. \*denota morfotipos que foram recuperados exclusivamente de crescimento em tapete. Fx- fungo, Bx – bactéria; ■ - morfotipos exclusivos da respectiva variedade.

Morfotipo	Variedade							
	Cobrançosa		Arbequina		Cordovil de Serpa		Galega Vulgar	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules	Folhas	Caules
				B8				
				B10*				
				B11				B11
				B13	B13	B13	B13	
			B14*					B14
		F19	F19	F19		F19	F19*	
	F20	F20	F20	F20	F20	F20	F20	
		F22		F22*	F22	F22		
	F23	F23						
								F27
								F28
		B29			B29			
								F30
				B31				
	F32		F32	F32	F32		F32	F32
					F34	F34		
		F36		F36	F36*			
							F39	
			F40					
							B43	
	B44						B44	
		B45	B45	B45			B45*	
	B47						B47	
		B48		B48*		B48*		
	B50	B50				B50		
			F53					F53
								F54
	B55	B55		B55*		B55*		
				B56*				
		B61						
								F63
							F64	
			F65					F65

**Tabela 2** – Comparação do número de morfotipos isolados de cada variedade e do ratio (%) de morfotipos comuns entre caules e folhas da mesma variedade.

	Variedade			
	Cordovil de Serpa	Cobranços a	Arbequina	Galega Vulgar
Ratio de morfotipos comuns entre caules e folhas (%)	36%	29%	22%	5%
Número de morfotipos isolados	11	14	18	19

## **Relação entre a infecção por *Xylella fastidiosa* e estado nutricional de plantas hospedeiras**

M.R. Menino, M.A. Castelo-Branco & P. Sá-Pereira

Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal, Laboratório Nacional de Referência em Sanidade Vegetal e Laboratório de Solos e Nutrição Vegetal, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Quinta do Marquês, 2784 – 505 Oeiras, Portugal. regina.menino@iniav.pt

### **Resumo**

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria de quarentena, transmitida por insetos sugadores do fluido xilémico, que causa diversas doenças num elevado número de espécies vegetais, com graves consequências económicas. A bactéria já começou a causar prejuízos na Europa e, apesar de ainda não ter sido identificada em Portugal, é uma preocupação para os agricultores e entidades sanitárias. Sabe-se que a nutrição adequada promove a sanidade das plantas, munindo-as de capacidade para resistir às adversidades do meio ambiente. No presente trabalho apresenta-se uma revisão sobre a relação entre o estado nutricional das plantas e a sua relação com a infecção causada por este agente, bem como resultados obtidos no âmbito do projeto FCT XF-Freeolive.

**Palavras-chave:** bactéria, fitossanidade, hospedeiros, oliveira, teores foliares.

### **Abstract**

*Xylella fastidiosa* is a quarantine bacterium, transmitted by xylem fluid-sucking insects, which causes various diseases in a large number of plant species, with serious economic consequences. The bacteria have already begun to cause damage in Europe and, although it has not yet been identified in Portugal, is a concern for farmers and health entities. Adequate nutrition is known to promote the health of plants, providing them with the capacity to withstand the adversities of the environment. In the present work a review is presented on the relation between the nutritional status of the plants and with the infection caused by this agent, as well as results obtained in the scope of the XF-Freeolive FCT project.

**Keywords:** bacteria, phytosanity, hosts, olive, foliar contents.

### **Importância da *Xylella fastidiosa***

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria patogénica considerada como organismo de quarentena, pertencente ao grupo das bactérias “Gram-negativas”, que aparece na lista de possíveis agentes biológicos que podem ser utilizados no bioterrorismo, afeta um grande número de culturas comercialmente importantes, causando várias doenças, com até 350 espécies hospedeiras já conhecidas (EFSA, 2015). Esta bactéria pode causar graves prejuízos em culturas economicamente muito importantes para nossa região, como a oliveira, a videira, a laranjeira, o pessegueiro e a amendoeira, entre muitas outras, conforme referido por Jansen e Obradovic (2010). É transmitido de planta para planta por insetos-vetor que se alimentam do fluido xilémico, comumente conhecidos como cigarrinhas, das famílias de Cicadellidae, Cercopidae, Machaerotidae e Cicadidae (Almeida *et al.*, 2005).

De acordo com a revisão de Jansen e Obradovic (2010), esta bactéria tem vindo a causar danos em várias culturas economicamente importantes desde 1880, embora tenha sido descrita, classificada e designada apenas em 1987 por Wells e seus colaboradores, como sendo a causa da doença de Pierce em videiras. Posteriormente, foi identificada como sendo o agente causador de outras doenças, noutras culturas, apresentando sintomas diferentes (murchidão foliar, manchas cloróticas nas folhas, padrões irregulares de necrose foliar, queimaduras foliares, com consequente redução da quantidade e qualidade da produção, nanismo e "dieback"). Como é referido por Chatterjee *et al.* (2008), “as células bacterianas fixam-se nas paredes dos vasos do xilema e multiplicam-se, formando um biofilme de colónias aderidas que podem, quando suficientemente grandes, obstruir completamente os vasos do xilema, bloqueando, assim, o transporte de água”.

Geograficamente, a distribuição da *X. fastidiosa* tem estado restringida às zonas de clima quente, como regiões tropicais e subtropicais (De La Fuente, 2013). As infeções por *X. fastidiosa* foram relatadas nos Estados Unidos (Alabama, Arizona, Califórnia, Flórida, Geórgia, Louisiana, Mississippi, Missouri, Montana, Carolina do Norte, Carolina do Sul, Texas), México, Costa Rica, Argentina e Brasil (Hopkins e Purcell, 2002).

Sabe-se também que diferentes subespécies de *X. fastidiosa* infetam uma ampla gama de hospedeiros. A classificação das subespécies de *X. fastidiosa*, resultantes de estudos de similaridade de DNA e sequenciação ITS, permite reconhecer quatro subespécies: a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (videira, cafeeiro, alfafa, amendoeira, citrinos e ácer); a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (pessegueiro, ameixeira, sicômoro, ulmeiro e amendoeira); a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (citrinos e cafeeiro); e a *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (loendros) (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005).

Um dos maiores problemas desta doença é que ainda não existe tratamento eficaz e a maneira de controlar a infeção é através do controle do inseto vetor e do desenvolvimento de variedades tolerantes ou resistentes às bactérias (Hopkins e Purcell, 2002). Coletta-Filho *et al.* (2013) referem que, no Brasil, o controlo do CVC (Clorose Variegada dos Citrinos), causada pela infeção por *X. fastidiosa*, é feito através da eliminação de ramos e de árvores infestados, através do controlo químico dos vetores e através da plantação de plantas saudáveis, vindas de viveiros certificados.

Embora a principal incidência de *X. fastidiosa* na Europa seja a região italiana da Apúlia, existe um alto risco de disseminação desta doença para o resto da região do Mediterrâneo (EFSA, 2013; Sá-Pereira, 2015). Tal como Sá-Pereira (2015) refere, no caso particular de Portugal, esta possibilidade é elevada, devido ao facto de Portugal ter condições climáticas amenas, o inseto vector está presente em Portugal, a posição geográfica do país é muito importante no comércio global e alguns dos hospedeiros preferidos para o inseto são culturas mediterrânicas economicamente importantes, como oliveiras, videiras, citrinos e amendoeiras. No entanto, segundo o mesmo autor, a bactéria ainda não foi detectada em Portugal.

### **Importância do estado nutricional das plantas**

Os nutrientes são elementos indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos, incluindo plantas e organismos patogénicos. As doenças e pragas afetam plantas hospedeiras usando-as como fonte de nutrientes, limitando a produção agrícola. Como é sabido, uma nutrição equilibrada promove o bom estado sanitário das plantas, através da otimização de seu crescimento, proporcionando-lhes a capacidade de suportar as adversidades do meio ambiente. Também é importante enfatizar que “a otimização do crescimento das culturas e das propriedades nutricionais das culturas também requer profundo conhecimento dos mecanismos genéticos,

regulatórios e de transporte subjacentes à absorção, translocação e redistribuição dos minerais e nutrientes” (Maathuis, 2013).

A absorção de nutrientes minerais pelas plantas é feita a partir da solução do solo, entrando na planta através das raízes e transportada para os rebentos através dos vasos do xilema (White e Brown, 2010). A nutrição ideal/ótima da planta depende do tipo de planta e existem níveis limitantes, abaixo (deficiência) e acima (excesso) dos quais a planta se torna sintomática, apresentando sintomas específicos, dependendo do nutriente, e afetando o rendimento e a resistência da planta a doenças e pragas. Por outro lado, a disponibilidade, distribuição e utilização de nutrientes podem tornar-se reduzidas em plantas doentes e em plantas afetadas por pragas, alterando, conseqüentemente, o seu estado nutricional e causando sintomas típicos de deficiências.

Sobre este assunto, há algumas revisões onde é discutida a relação entre o estado nutricional das plantas e sua capacidade de manter-se saudável. Huber *et al.* (2012) fizeram uma revisão sobre a relação entre o estado nutricional das plantas e a sua susceptibilidade a doenças e pragas, onde relataram vários testemunhos que apontam para o facto de que o suprimento de nutrientes interfere com a resistência a doenças/pragas por parte das plantas e que esta resistência também é alterada pela resistência ou suscetibilidade das diferentes cultivares às doenças/pragas. Os mesmos autores afirmam, ainda, que o suprimento de nutrientes para a otimização do crescimento das plantas aumentará ou diminuirá de acordo com o agente patogénico/praga e o nutriente em questão.

Singh (2015) compilou informações indicativas de que os níveis de azoto (N) podem aumentar a severidade, na maioria dos casos, de agentes patogénicos vegetais obrigatórios, enquanto no caso de agentes patogénicos facultativos a incidência da doença pode ser diminuída com o aumento das taxas de N. Na sua revisão, aquele autor conclui que, na maioria dos casos, o potássio (K), o cloro (Cl) e o boro (B) aumentam a resistência das plantas a agentes patogénicos; o manganês (Mn) limita a disseminação de agentes patogénicos; e o zinco (Zn) e o fósforo (P) apresentam resultados inconsistentes.

Apesar do que foi exposto acima, Dordas (2008) afirma que “embora os nutrientes possam afetar a tolerância ou resistência das plantas aos agentes patogénicos, há relatos contraditórios sobre o efeito dos nutrientes nas doenças das plantas, e ainda há muita investigação a fazer para encontrar a combinação de nutrientes que pode ajudar a reduzir a gravidade da doença, sabendo que os nutrientes que são necessários para o crescimento das plantas são os mesmos que são necessários para os agentes patogénicos”. Essas considerações estão de acordo com as conclusões de Malavolta *et al.* (2005) para algumas doenças de citrinos, relativamente ao estado nutricional das plantas, que apontam a necessidade de mais estudos.

### **Relação entre infecção por *Xylella fastidiosa* e o estado nutricional das plantas**

Como foi referido anteriormente, a bactéria *X. fastidiosa* entra nos vasos do xilema, onde forma colónias, conduzindo à oclusão dos vasos. O xilema é o canal de distribuição de nutrientes desde a raiz até as folhas, tanto micro como macronutrientes necessários para múltiplas funções dentro de células procarióticas e eucarióticas (Hansch e Mendel, 2009; Maathuis, 2009). Estes minerais essenciais estão sob rígido controlo homeostático porque, embora necessários, podem ser tóxicos em altas concentrações ou causar desequilíbrios. A disponibilidade de minerais afeta as interações agente patogénico-hospedeiro, especialmente a sobrevivência de agentes patogénicos, a expressão de características de virulência e a fisiologia do hospedeiro.



Existem vários estudos relacionados com as alterações nutricionais, causadas pela infecção por *X. fastidiosa*, em diferentes espécies de plantas. Em 1988, Goodwin e colaboradores, trabalhando com videiras (*Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay'), compararam folhas de plantas sãs com folhas de plantas afetadas pela doença de Pierce (DP) e observaram que o crescimento vegetativo de videiras doentes era menor do que o de vinhas saudáveis cultivadas nas proximidades. Em comparação com as folhas saudáveis, as folhas doentes tinham concentrações mais elevadas de cálcio (Ca) e magnésio (Mg), mas uma concentração mais baixa de K. Com base nas alterações fisiológicas estudadas, foi proposto que os sintomas da DP eram o resultado de um ligeiro, mas prolongado stress hídrico que acelera a senescência foliar (Goodwin *et al.*, 1988).

O cálcio, o Mg e o ferro (Fe) foram implicados no processo de infecção por *X. fastidiosa*. No entanto, segundo Leite *et al.* (2002), “tem sido sugerido ser não-específico em alguns casos (e.g. Ca, Mg), com estes elementos desempenhando um papel de ponte para a adesão entre as células bacterianas, negativamente carregadas, e os vasos do xilema”.

Na década de 1990 foram realizados diversos estudos sobre o concentração foliar de nutrientes em citrinos e a ferrugem dos citrinos (Clorose Variegada dos Citrinos - CVC, no Brasil), com resultados consistentes indicando que o teor de K foliar foi menor nas plantas sintomáticas (Malavolta *et al.*, 2005). Os mesmos autores referem que Wutscher e colaboradores, em 1994, encontraram menores concentrações de P e K nas plantas afetadas; e Salvo, em 2001, registou valor inferior dos teores de N, P e Ca nas folhas.

Mais recentemente, Andersen *et al.* (2007), sabendo que a *X. fastidiosa* é o agente causador da doença de Pierce em videiras e que os mecanismos de patogenicidade são em grande parte devido à oclusão de vasos do xilema, por agregação de *X. fastidiosa* e formação de biofilme, examinaram os efeitos dos componentes nutricionais sobre o crescimento bacteriano *in vitro* e observaram que o crescimento planctónico de *X. fastidiosa* no fluido xilémico da *Vitis* estava correlacionado com a concentração de iões inorgânicos, nomeadamente, cobre (Cu), Mg, P e Zn.

Os sintomas da infecção por *X. fastidiosa* assemelham-se a desequilíbrios nutricionais do hospedeiro. Acredita-se que esses desequilíbrios sejam causados por deficiente suprimento de água ou por mecanismos relacionados com o sequestro de minerais por parte das bactérias. Sabendo que os citrinos infectados por *X. fastidiosa* apresentam deficiências nutricionais, provavelmente causadas pela produção de polímeros extracelulares pelas bactérias que bloqueiam o fluxo normal de nutrientes através do xilema, Silva-Stenico *et al.* (2009), estudando a composição mineral de áreas foliares específicas em diferentes estágios de infecção em citrinos, mediram a concentração de macro e micronutrientes em folhas de plantas infectadas. Estes investigadores observaram que a deficiência em P e K ocorria em árvores com sintomas de ataque da bactéria e verificaram, também, a existência de concentrações elevadas de Fe, Mn e Zn, em zonas onde havia plantas com clorose.

Utilizando ensaios *in vitro*, Cobine *et al.* (2013) observaram que a taxa de crescimento de *X. fastidiosa* estava correlacionada com a concentração de Cu, Mg, P e Zn, entre outros componentes como aminoácidos e ácido cítrico, reforçando o papel dos elementos minerais na agregação e formação de biofilme e, portanto, o papel no estabelecimento da infecção, sugerindo estratégias para o planeamento de tratamentos para as culturas infectadas pela *X. fastidiosa* baseadas na indução de mudanças na homeostasia desses elementos.

Também em ensaios *in vitro*, Cruz (2013) obteve resultados que levaram à conclusão de que a suplementação com Ca promove a infecção pela *X. fastidiosa*, aumentando as populações bacterianas e intensificando os sintomas da doença. Por outro lado, a presença das bactérias na planta promove a acumulação de Ca nos seus tecidos, acima dos níveis proporcionados pela adubação com Ca. Os resultados da investigação realizada por Cruz, em 2013, sugerem que o Ca atua como um dos principais reguladores da virulência da *X. fastidiosa*.

Trabalhando com culturas líquidas de *X. fastidiosa* suplementadas com Zn, Navarrete e De La Fuente (2014) concluíram que o Zn poderia ser usado como um tratamento bactericida, mas poderia ter o efeito indesejado de promover a formação de um biofilme mais forte em eventos de reinoculação.

Em Itália, houve uma correlação entre o fraco estado nutricional das árvores afetadas e o nível de infecção, com o ataque preferencial às oliveiras centenárias (Saponari *et al.* 2013). Alguns investigadores referem que os mecanismos de controlo da doença são ativados através da gestão adequada de nutrientes, uma vez que são estes constituintes vegetais que regulam a atividade metabólica associada à resistência das plantas e à virulência do agente patogénico. Uma nutrição adequada promove o bom estado sanitário das plantas, proporcionando-lhes a capacidade de suportar as adversidades do meio ambiente (Sá-Pereira, 2015).

Apesar de todas as informações disponíveis sobre a importância da nutrição adequada das plantas, quando queremos saber até que ponto as plantas são suscetíveis a ataques, no caso da bactéria *X. fastidiosa*, os estudos devem ser levados a cabo em plantas saudáveis, com conteúdo de nutrientes adequado às espécies e variedade em questão, para que possamos comparar o que varia quando ocorre uma infecção e, em seguida, utilizar medidas de suplementação nutricional que diminuam a proliferação bacteriana, ativando os sistemas de imunidade primária das plantas (Sá-Pereira, 2015).

### **Resultados obtidos no âmbito do projeto XF-Freeolive**

No âmbito do projeto XF-Freeolive (PTDC/AGR-PRO/0856/2014), foram feitas colheitas de amostras de terra onde estão instalados os olivais em estudo neste mesmo projeto, bem como a colheita de amostras de material vegetal (folhas), das diferentes variedades de oliveira, no sentido de proceder a uma avaliação do estado nutricional das plantas para comparar com plantas infetadas com a bactéria *X. fastidiosa* e perceber até que ponto a nutrição se relaciona com o potencial de infecção.

No Quadro 1 apresentam-se os resultados dos valores médios das análises das terras colhidas nos dois locais (Serpa e Mirandela) onde se encontram estabelecidos os olivais. Através das análises efetuadas verificou-se que o solo de Serpa é de textura franco-argilosa e pH alcalino, enquanto o solo de Mirandela tem textura Franco-arenosa e pH neutro, quanto aos restantes parâmetros avaliados, os valores de N e de P são considerados baixos, os de K são médios.

No Quadro 2 são apresentados os valores médios dos resultados obtidos da análise química das folhas de diversas variedades de oliveira, cultivadas em Serpa (amostras colhidas dia 25/10/2016) e em Mirandela (amostras colhidas em 25/10/2016 e em 07/04/2017). Estes olivais têm sido acompanhados e estão isentos de *X. fastidiosa*. De uma forma geral, em Serpa, houve diferenças significativas entre variedades no que diz respeito aos teores dos diversos elementos analisados, ressaltando o facto de os valores serem mais elevados nas variedades Galega e Arbequina, exceção feita ao N e ao Zn, que são mais baixos na Arbequina. No que diz respeito às variedades de Mirandela, os valores

foram sempre mais elevados para a Verdeal e a Madural apresentou valores significativamente mais baixos de P.

Ainda no Quadro 2, analisando os valores obtidos para as diferentes variedades, em ambos os locais e nas diferentes datas, verificou-se o seguinte: a Cobrançosa apresentou valores mais elevados em Mirandela, excetuando para o Ca, e para o Cu, contudo, a diferença registada para a concentração de Cu deve-se ao facto de ter havido um tratamento à base deste elemento em Serpa; a Madural, na colheita de 25/10/2016, apresentou valores mais baixos de N, P e Fe, e mais elevados dos restantes elementos; e a Verdeal, na colheita datada de 25/10/2016, apresentou concentrações de elementos superiores de Na e K e inferiores de Mn.

No Quadro 3 são apresentados os valores dos resultados da análise química foliar das amostras colhidas no dia 17/12/2017, nas diferentes variedades de oliveira (Galega, Cordovil, Cobrançosa e Arbequina), cultivadas no substrato “Siroлива”, em estufa. Comparando os resultados obtidos com valores de referência para oliveiras, em geral, verifica-se que as concentrações foliares registadas estão dentro da gama de valores considerados adequados, exceção feita para o N, que é considerado deficiente.

### Referências

- Almeida RPP, Wistrom C, Hill BL, Hashim J and Purcell AH, 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa* to dormant grape. *Plant Disease* 89:419-424.
- Andersen PC, Brodbeck BV, Oden S, Shriner A and Leite B, 2007. Influence of xylem fluid chemistry on planktonic growth, biofilm formation and aggregation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 274(2):210-7.
- Cobine PA, Cruz LF, Navarrete F, Duncan D, Tygart M and De La Fuente L, 2013. *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm and planktonic cells. *PLoS ONE* 8: e54936
- Coletta-Filho HD, Gonçalves FP, Amorim L, de Souza AA and Machado MA, 2013. Survey of *Xylella fastidiosa* and citrus variegated chlorosis in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 95(3): 493-498.
- Cruz LF, 2013. The role of calcium in the regulation of *Xylella fastidiosa* virulence. Ph.D. Dissertation in Plant Pathology, submitted to the Graduate Faculty of Auburn University, Auburn, Alabama. 150 p.
- Dordas C, 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28:33-46. doi: 10.1051/agro:2007051.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2015. Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal*, vol.13, n.1, 262 pp.
- Goodwin PH, Devay JE and Meredith CP, 1988. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay to infection by the Pierce's disease bacterium. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 17-32.
- Hänsch R and Mendel RR, 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol* 12:259-266.
- Hopkins DL and Purcell AH, 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86:1056-1066. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.10.1056.
- Huber D, Römhild V and Weinmann M, 2012. Relationship between Nutrition, Plant Diseases and Pests. *In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.* pp.283-298. doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00010-8

- Huber DM, 1978. Disturbed mineral nutrition. In Plant Disease: An Advanced Treatise. Eds. J G Horsfall and E B Cowling, vol. 3, pp 163-181. Academic Press, New York.
- Janse D and Obradovic A, 2010. *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks. Journal of Plant Pathology, vol. 92, n. 1 Supplement, p. S1. 35-S1.48
- De La Fuente L, Parker JK, Oliver JE, Granger S, Brannen PM, van Santen E and Cobine PA, 2013. The bacterial pathogen *Xylella fastidiosa* affects the leaf ionome of plant hosts during infection. PLoS ONE 8(5): e62945. doi:10.1371/journal.pone.0062945
- Maathuis FJM and Diatloff E, 2013. Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients. In: Frans J.M. Maathuis (ed.), Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 953:1-31. doi: 10.1007/978-1-62703-152-3\_1.
- Maathuis FJM, 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. Curr Opin Plant Biol 12:250–258.
- Malavolta E, de Oliveira SC, Pereira C, Lavres J, Jr Prates HS, Malavolta M and Ferreira M, 2005. Composição mineral de folhas de citros afetadas por declínio, amarelinho (CVC), morte súbita e Huanglongbing (HLB). Informações Agrônomicas. 110:3-6. [http://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/22\\_Malavolta\\_05.pdf](http://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/22_Malavolta_05.pdf)
- Navarret F and De La Fuente L, 2014. Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decrease culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. Applied and Environmental Microbiology, 80(3):1097-1107.
- Saponari M, Boscia D, Nigro F and Martelli GP, 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Journal of Plant Pathology, 95:659–668.
- Sá Pereira P, 2015. *Xylella fastidiosa* – a new menace for Portuguese agriculture and forestry. Revista de Ciências Agrárias, 38(2): 150-156.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi M and Chang CJ, 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Syst Appl Microbiol. 27:290–300. doi: 10.1078/0723-2020-00263.
- Schuenzel EL, Scally M, Stouthamer R and Nunney L, 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Appl Environ Microbiol. 71:3832–3839. doi: 10.1128/AEM.71.7.3832-3839.2005.
- Silva-Stenico ME, Pacheco FTH, Pereira-Filho ER, Rodrigues JLM, Souza AN, Etchegaray A, Gomes JE and Tsai SM, 2009. Nutritional deficiency in citrus with symptoms of citrus variegated chlorosis disease. Brazilian Journal of Biology 69: 859–864.
- Singh DP, 2015. Plant Nutrition in the Management of Plant Diseases with Particular Reference to Wheat. In: Awasthi L.P. (eds) Recent Advances in the Diagnosis and Management of Plant Diseases. pp 273-284. Springer, New Delhi. doi: 10.1007/978-81-322-2571-3\_20
- White PJ and Brown PH, 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany, 105:1073-1080. doi:10.1093/aob/mcq085

**Quadros e Figuras**

**Quadro 1-** Valores dos resultados da análise química das amostras compósitas dos solos (0-30 cm profundidade) onde estão implantados os olivais em estudo (Serpa e Mirandela)

Região	M.O. g kg <sup>-1</sup>	pH	N Kjeldhal g kg <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> O Riehm mg kg <sup>-1</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Olsen mg kg <sup>-1</sup>	Classificação textural
Serpa	16,7	8,6	0,62	80	6,4	Franco-argilosa
Mirandela	10	6,69	0,5	48	7,5	Franco-arenosa

**Quadro 2-** Valores médios (n=24) dos resultados da análise química foliar de diferentes variedades de oliveira (Galega, Cordovil, Arbequina, Cobrançosa, Madural e Verdeal), de amostra colhidas em 25/10/2016 (Serpa e Mirandela) e em 7/4/2017 (Mirandela)

Local	N	P	Na	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
Variedade	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>			
Serpa										
25/10/2016										
Galega	15 a	1,2 c	1,8 a	10 a	25 a	2,4 ab	37 ab	30 a	25 a	100 b
Cordovil	12 c	1,2 c	1,4 b	6,5 b	24 a	2,2 b	32 b	29 a	11 b	133 ab
Arbequina	12 c	1,8 a	1,7 a	10 a	23 a	2,7 a	44 a	29 a	14 b	169 a
Cobrançosa	14 bB	1,5 bB	1,3 bB	7,9 bB	26 aA	1,5 cA	44 aA	30 aA	12 bA	105 bA
Mirandela										
25/10/2016										
Madural	18 aB	1,5 cB	2,3 aA	15 bA	12 aA	1,6 aA	48 aB	23 bA	22 aA	4,1 aB
Verdeal	18 aA	2,1 aA	2,4 aA	18 aA	12 aA	1,7 aA	46 aA	28 aB	22 aA	5,1 aA
Cobrançosa	19 aA	1,7 bA	2,0 bA	13 bA	12 aB	1,7 aA	42 aA	30 aA	22 aB	4,4 aB
7/4/2017										
Madural	19 aA	1,7 bA	1,4 aB	8,3 aB	13 aA	1,8 aA	59 aA	25 bA	13 aB	4,7 aA
Verdeal	19 aA	2,1 aA	1,4 aB	8,5 aB	13 aA	1,8 aA	53 aA	33 aA	13 aB	4,4 aA

Para cada data e local, médias na mesma coluna, com a mesma letra minúscula, não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey. Para cada variedade, médias na mesma coluna, com a mesma letra maiúscula, não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

**Quadro 3-** Valores médios (n=14) dos resultados da análise química foliar das diferentes variedades de oliveira (Galega, Cordovil, Cobrançosa e Arbequina), cultivadas no substrato “Siroliva”, em estufa, colhidas em Dezembro de 2017.

Variedade	N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>			
Galega	11	1,12	5,8	1,54	21	3,48	40	30	50	30
Cordovil	13	1,38	7,9	1,57	12	1,93	40	20	20	30
Cobrançosa	11	2,33	8,6	1,67	17	1,81	40	30	10	40
Arbequina	14	1,40	6,9	1,61	16	2,27	30	20	50	30

## Captura em massa de *Bactrocera oleae* no sul de Portugal

Maria Albertina Gonçalves<sup>1,2</sup> & José Gonçalves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Algarve/FCT, Campus de Gambelas, 8005-139 FARO

<sup>2</sup>MedtiBio, Centre for Mediterranean Bioresources and Food, Campus de Gambelas, 8005-139 FARO, magoncal@ualg.pt

<sup>3</sup>Universidade do Algarve/ISE, Campus da Penha, 8005-139 FARO

### Resumo

Este trabalho teve como objetivo determinar a eficácia da captura em massa da mosca-da-azeitona, com o auxílio de armadilhas tipo “Olipe”. Os nossos estudos foram conduzidos num olival tradicional de sequeiro, com cerca de 3 ha, da variedade “Maçanilha Algarvia”, situado no concelho de Alcoutim (Algarve). O olival foi dividido em duas parcelas de 1,5 ha cada. Uma das parcelas funcionou como testemunha. Na parcela tratada, instalou-se uma armadilha tipo “Olipe” em cada árvore, para a captura em massa. Para avaliação da eficácia do método, marcaram-se 6 armadilhas tipo “Olipe” colocadas na zona central da parcela tratada. Em cada parcela, foram instaladas 5 armadilhas cromotrópicas adesivas de cor amarela com feromona sexual, e 5 copos mosqueiros “Tephri traps” com proteína hidrolisada, para monitorização da população adulta da mosca. As armadilhas tipo “Olipe” foram iscadas com 1 L de solução de fosfato diamónio a 5% (50 g L<sup>-1</sup>). Todas as armadilhas foram colocadas na zona sul da copa das árvores, aproximadamente a 1,5 m acima da superfície do solo. As observações foram realizadas semanalmente, no período compreendido entre 1 de julho e 30 de novembro, nos anos de 2015, 2016 e 2017. Desde as primeiras capturas da mosca nas armadilhas até à colheita, em cada parcela, recolheram-se 100 frutos de 10 árvores escolhidas aleatoriamente. Sempre que necessário, fez-se o acrescento da solução de fosfato diamónio e da proteína hidrolisada, bem como a substituição das armadilhas cromotrópicas. Os resultados obtidos indicam que o número de frutos atacados foi sempre menor na parcela sujeita à captura em massa, e que a densidade da população adulta da mosca foi sempre superior na parcela testemunha. Este trabalho demonstra que a técnica da captura em massa, com recurso às armadilhas tipo “Olipe”, poderá ser um bom método de proteção contra a praga, em olivais no Algarve.

**Palavras-chave:** *Olea europaea*, mosca-da-azeitona, armadilhas, proteção, Algarve.

### Abstract

This study aimed to determine the effectiveness of the mass trapping technique against the olive fruit fly with the aid of "Olipe" traps. Our studies were conducted in a traditional olive grove of the "Maçanilha Algarvia" cultivar, located in the municipality of Alcoutim (Algarve). The olive grove was about 3 ha and was divided into two plots of 1.5 ha each. In the treated plot an "Olipe" trap per tree was installed and in the control plot no "Olipe" traps were installed. To assess of the effectiveness of the mass trapping technique, 6 "Olipe" traps of the treated plot were marked. To monitoring the adult olive fruit fly population, 5 yellow sticky traps with sexual pheromone and 5 Tephri traps with hydrolyzed protein were installed in each plot. The "Olipe" traps were baited with 1 L of diammonium phosphate solution at 5% (50 g L<sup>-1</sup>). All traps were placed in the southern part of the tree canopy, approximately 1.5 m above the soil surface. Our observations were carried out weekly between July 1 and November 30 in the years 2015, 2016 and

2017. Since the first fruit fly catches in traps to harvest, in each plot, 100 fruits of 10 randomly chosen trees were collected. The addition of the of diammonium phosphate solution and hydrolyzed protein as well as the replacement of the yellow sticky traps were done when necessary. The results indicate that the number of damaged fruits was always lower in the treated plot and the adult olive fruit fly density was always higher in the control plot. This work demonstrates that the mass trapping technique using "Olipe" traps might be a good control method against the olive fruit fly in Algarve.

**Keywords:** *Olea europaea*, olive fruit fly, traps, control, Algarve.

## Introdução

A oliveira, *Olea europaea* L. (Família: Oleaceae), é uma árvore robusta e bem adaptada às condições edafoclimáticas da região da bacia mediterrânea. Sendo uma das plantas cultivadas mais antigas na região, faz parte da sua paisagem natural (Gonçalves, 2016). Os seus frutos são muito apreciados pelo homem e também por outros animais que os utilizam na sua alimentação. Trata-se de uma espécie botânica originária da Ásia menor e que foi difundida pela região mediterrânea através das invasões e trocas comerciais que se deram nesta região. Os Gregos aperfeiçoaram a suas técnicas de cultivo, pois acreditavam que a oliveira lhes dava força e vida. Atualmente encontra-se amplamente difundida, sendo cultivada nas Américas, África do Sul, Austrália e Japão. Os principais países produtores de azeitonas são Espanha, Itália, Grécia, Turquia, Tunísia, Marrocos, Síria, Argentina e Portugal. O interesse nesta cultura reside na importância dos seus frutos (as azeitonas), utilizados para produção de azeite ou para conserva (azeitona de mesa e pickles). O interesse crescente nesta cultura para os mais diversos fins (alimentação, medicina, cosmética, entre outros), tem contribuído para a intensificação da produção do olival. Atualmente, podemos encontrar vários sistemas de condução do olival: tradicional, intensivo e superintensivo. No Algarve, encontramos a oliveira em cultura extensiva ou, na maioria dos casos, coexistindo com outras culturas típicas da região, como sejam a alfarrobeira, a figueira e a amendoeira. Apesar de ser uma cultura milenar, bastante robusta e amplamente difundida, como qualquer outra cultura pode ser alvo de vários problemas sanitários, dos quais se destacam as pragas. Relativamente às pragas, os insetos assumem particular importância e são várias as espécies que atacam o olival (Gonçalves & Afonso, 2008; Gonçalves, 2014; Gonçalves, 2016). Na zona da bacia mediterrânea, a mosca-da-azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) é a principal praga da cultura, afetando negativamente a produção de azeitonas, através da diminuição da quantidade e da qualidade do azeite e da azeitona de mesa (Gonçalves & Andrade, 2012). As picadas de postura que a fêmea faz sobre os frutos, são suficientes para lhes retirarem valor comercial, caso estes se destinem à produção de azeitona de mesa. No caso da produção de azeite, os prejuízos quantitativos devem-se ao consumo de parte da polpa pelas larvas da mosca, e da provável queda prematura dos frutos atacados, enquanto os prejuízos qualitativos são resultado da perda de qualidade do azeite obtido dos frutos atacados pela mosca. Relativamente à proteção fitossanitária contra a mosca-da-azeitona, a legislação comunitária e a nacional têm vindo a restringir o uso ou a proibir a utilização dos inseticidas mais eficazes contra a praga (Coutinho et al., 2009). Assim, a procura de métodos de proteção contra a praga, alternativos à luta química, assume grande relevância. É uma prática corrente e tem tido resultados muito promissores, a técnica da captura em massa com atrativos sexuais ou alimentares, contra pragas de importância económica (Gonçalves, 2017a; Gonçalves, 2017b). No caso concreto da mosca-da-azeitona, a luta biotécnica contra esta praga tem dado bons resultados em diferentes



situações, quer através da captura em massa, utilizando dispositivos como as chamadas armadilhas tipo “Olipe”, quer através da aplicação de luta atraticida (Pereira et al., 2015). Este trabalho foi realizado num olival tradicional de sequeiro, e teve como objetivo determinar a eficácia da captura em massa da mosca-da-azeitona com o auxílio de armadilhas tipo “Olipe”, iscadas com fosfato diamónio a 5%, no Algarve.

### **Material e métodos**

Este estudo decorreu no período compreendido entre 1 de julho e 30 de novembro, nos anos de 2015, 2016 e 2017. Os trabalhos foram conduzidos num olival tradicional de sequeiro, com cerca de 3 ha, da variedade “Maçanilha Algarvia”, com mais de 40 anos, situado no concelho de Alcoutim (Algarve). O compasso de plantação é de 10 m × 10 m, ou seja 100 árvores por hectare. O sistema de gestão do solo era o enrelvamento permanente, constituído por um prado natural com predomínio de leguminosas e gramíneas. O olival foi dividido em duas parcelas com cerca de 1,5 ha cada. Numa das parcelas instalaram-se as armadilhas tipo “Olipe” (parcela tratada) e a outra parcela funcionou como testemunha (fig. 1). Várias técnicas de amostragem foram utilizadas para determinação da eficácia da captura em massa da mosca-da-azeitona com recurso a armadilhas tipo “Olipe”.

#### *Armadilhas tipo “Olipe”:*

Na parcela tratada, instalou-se uma armadilha tipo “Olipe”, em cada árvore, num total de 150 armadilhas, para a captura em massa da mosca. As armadilhas tipo “Olipe” eram constituídas por garrafas de polietileno transparente de 1,5 L. Para avaliação da eficácia do método, marcaram-se 6 armadilhas tipo “Olipe” colocadas na zona central da parcela tratada em forma hexagonal (fig. 1). As armadilhas tipo “Olipe” foram iscadas com 1 L de solução de fosfato diamónio a 5% (50 g L<sup>-1</sup>). Todas as armadilhas foram colocadas na zona sul da copa das árvores, aproximadamente a 1,5 m acima da superfície do solo. A reposição da solução de fosfato diamónio foi feita, sempre que se julgou necessário, de modo a manter sempre cerca de 1 L de solução atrativa. Semanalmente contabilizaram-se os insetos nas armadilhas marcadas.

#### *Armadilhas cromotrópicas adesivas de cor amarela com feromona sexual (=armadilhas sexuais):*

Em cada uma das parcelas do ensaio, foram instaladas 5 armadilhas sexuais dispostas aproximadamente em X, distanciadas, entre si, 50 m na horizontal e 80 m na longitudinal, com exceção da armadilha próxima do centro da forma em X, que distava, na diagonal, 45 m das armadilhas situadas à esquerda e 50 m das armadilhas situadas à direita (fig. 1). As armadilhas foram colocadas a uma altura de 1,5 m acima da superfície do solo, na zona sul da copa das árvores. As observações realizaram-se semanalmente. As armadilhas foram substituídas a cada 6 semanas.

#### *Copos mosqueiros “Tephri traps”:*

Em cada uma das parcelas, foram instalados 5 copos mosqueiros “Tephri traps” iscados com proteína hidrolisada, para monitorização da população adulta da mosca. As armadilhas foram colocadas no centro da parcela, dispostas aproximadamente em X, distanciadas, entre si, de 70 m na horizontal e de 80 m na longitudinal, com exceção da armadilha próxima do centro da forma em X. Esta distava, na diagonal, 57 m das armadilhas situadas à esquerda e 50 m das armadilhas situadas à direita (fig. 1). Os copos mosqueiros foram suspensos na zona sul da copa das árvores, a 1,5 m acima da superfície

do solo, e colocados nas árvores imediatamente ao lado daquelas onde estavam as armadilhas sexuais (fig. 1). Semanalmente foram contabilizadas as capturas de mosca e feita reposição da proteína hidrolisada.

#### *Material vegetal (frutos):*

Desde as primeiras capturas da mosca nas armadilhas até à colheita, em cada parcela, recolheram-se 100 frutos de 10 árvores escolhidas ao acaso. Os frutos eram colocados em sacos de plástico fechados e levados para o laboratório, em mala térmica, para avaliação do ataque de mosca. No laboratório era registado o número de frutos com orifícios de saída das larvas, o número de frutos com larvas vivas e o número de frutos com larvas mortas. Os registos serviram de base para a determinação da percentagem de frutos atacados pela mosca em cada parcela do olival (parcela testemunha e parcela tratada).

Os resultados foram sujeitos a uma comparação de médias pela aplicação do teste de Student a 5% de probabilidade. Sempre que se justificou, adicionaram-se linhas de tendência linear, com indicação dos respetivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

### **Resultados e Discussão**

Os resultados do presente estudo relativo à eficácia da captura em massa da mosca-da-azeitona, com recurso a armadilhas tipo “Olipe”, encontram-se representados graficamente nas figuras 2 a 5.

Na figura 2 está indicado o número total de exemplares de mosca-da-azeitona capturado nas 6 armadilhas tipo “Olipe”, na parcela do olival sujeita à captura em massa (parcela tratada), nos três anos em que decorreu o ensaio. Por observação da figura 2, verifica-se que a densidade populacional dos adultos de mosca-da-azeitona foi muito mais elevada no primeiro ano do ensaio do que nos anos seguintes. Verifica-se ainda uma clara tendência para a diminuição da população do inseto na parcela tratada (parcela sujeita à captura em massa), traduzida por uma reta de inclinação negativa com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) aproximadamente igual a 1. Este facto poderá estar diretamente relacionado com a eficácia da técnica da captura em massa através de armadilhas tipo “Olipe” iscadas com fosfato diamónio a 5%.

No conjunto dos três anos verifica-se que, quer nas armadilhas sexuais quer nas armadilhas Tephri, existe uma clara diminuição da população de mosca-da-azeitona, na parcela tratada. Em ambos os tipos de armadilhas, as tendências para a diminuição da praga, na parcela do olival tratada, são traduzidas por retas de inclinação negativa cujos coeficientes de determinação são próximos de 1 (figs. 3 e 4). Ao longo dos três anos, na parcela testemunha, os valores das densidades populacionais da mosca-da-azeitona mantiveram-se sem alterações notórias, para ambos os tipos de armadilhas. No entanto, o número de exemplares do inseto capturado foi significativamente mais elevado na parcela testemunha do que na parcela sujeita à captura em massa [ $p = 0,0237$  (armadilhas sexuais);  $p = 0,0164$  (armadilhas Tephri)]. Nas armadilhas Tephri capturaram-se sempre mais exemplares da praga do que nas armadilhas sexuais, o que já era esperado, pois o atrativo alimentar atrai exemplares de ambos os sexos (figs. 3 e 4).

Os valores das percentagens de frutos atacados pela mosca-da-azeitona foram sempre superiores na parcela testemunha face aos valores obtidos na parcela tratada ( $p = 0,0098$ ). Nesta parcela é visível a tendência para a diminuição da percentagem de frutos atacados ao longo dos três anos do ensaio (fig. 5).

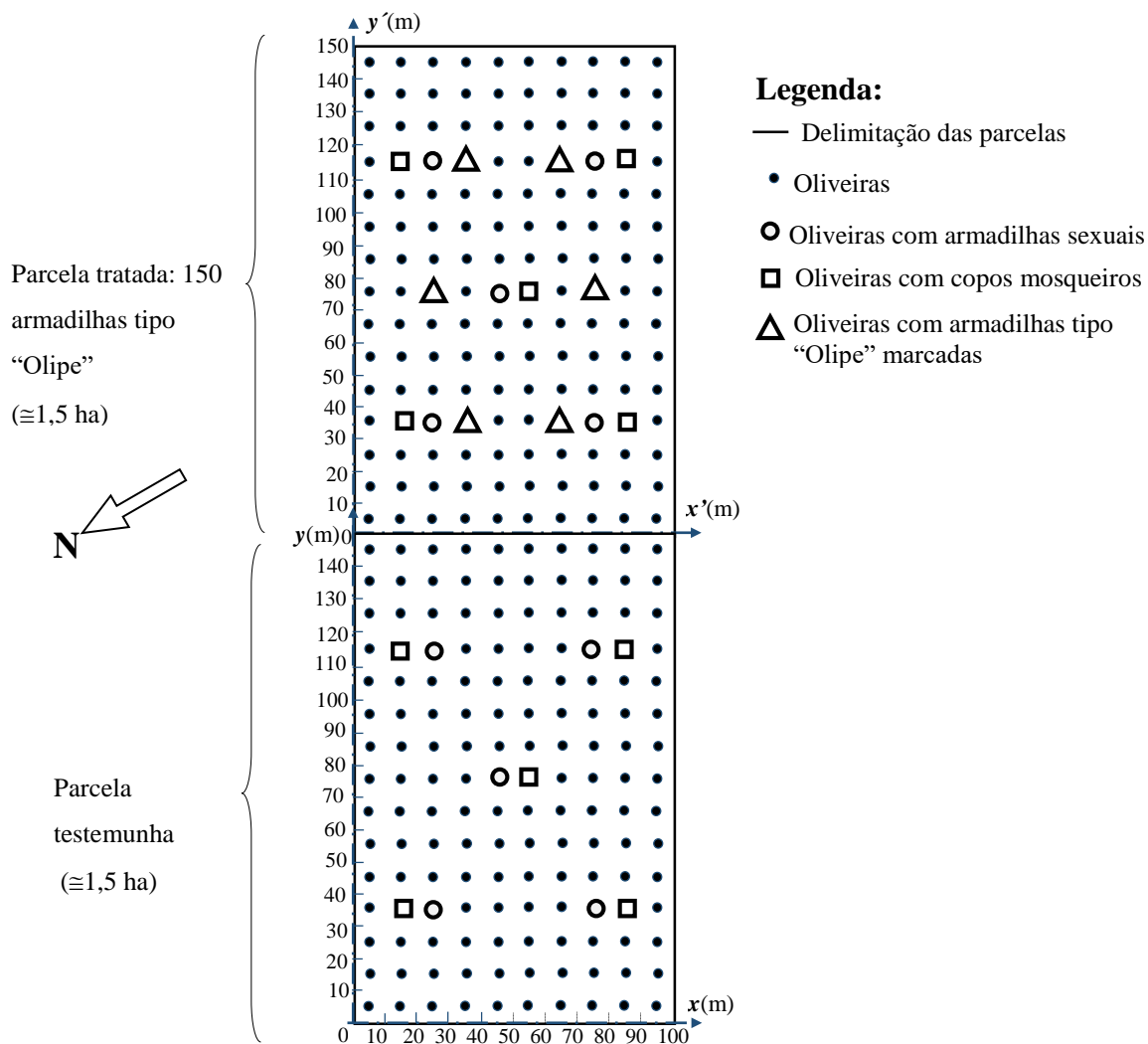
## Conclusões

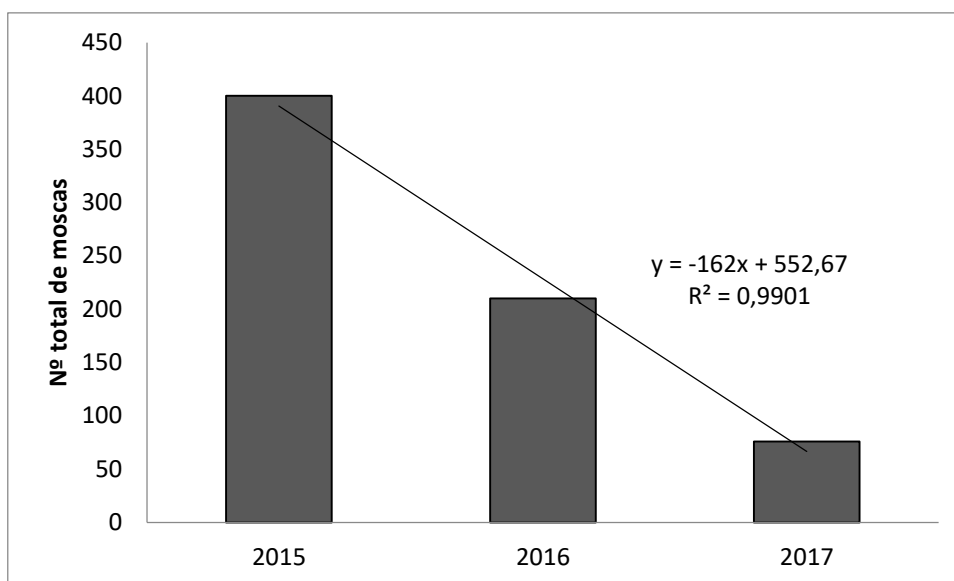
Os resultados obtidos neste ensaio permitem-nos concluir que a técnica da captura em massa com recurso a armadilhas tipo “Olive”, iscadas com fosfato diamónio a 5%, é uma técnica promissora para proteção contra a mosca-da-azeitona, no Algarve, em oliveiras da variedade “Maçanilha Algarvia”. Nas condições estudadas, verificou-se uma diminuição notável, quer na densidade populacional de adultos do inseto quer na percentagem de frutos atacados, na parcela sujeita à captura em massa, ao longo dos três anos de observação.

## Referências

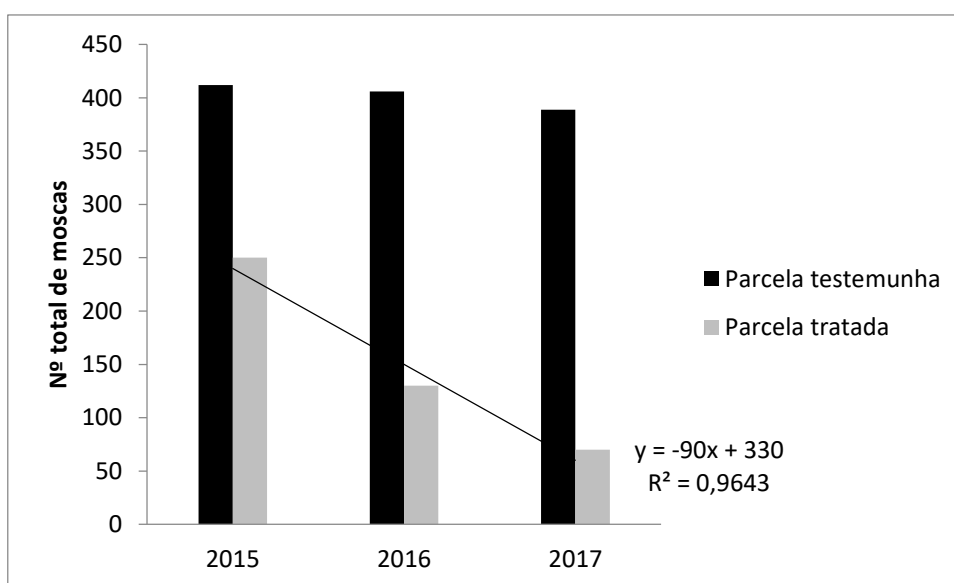
- Coutinho, J., Amaro-Silva, M.C., Outão, F., Gouveia, C., Vitorino, C., Henriques, L., Luz, J.P. & Peres, F. 2009. Eficácia de armadilhas Olive na captura em massa da mosca-da-azeitona (*Bactrocera oleae*) em oliveiras em agricultura biológica na Beira Interior Sul. Actas Portuguesas de Horticultura 14: 101-107.
- Gonçalves, M.A. 2017a. Mass trapping for the control of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on fig trees in Southern Portugal (Algarve). Acta Horticulturae 1173: 269-272.
- Gonçalves, M.A. 2017b. Mass trapping of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) on pomegranate in Southern Portugal (Algarve). IV International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits, Elche, Spain 18-22 September. 1p.
- Gonçalves, M.A. 2016. Diversidade de himenópteros associados à cultura da oliveira (*Olea europaea*), no sul de Portugal. Actas Portuguesas de Horticultura 25: 138-142.
- Gonçalves, M.A. 2014. Diversidade de artrópodes associados à oliveira (*Olea europaea* L.), no Algarve. Ecologi@ 7: 70-76.
- Gonçalves, M.A. & Andrade, L. 2012. Entomofauna associated with the olive tree in southern Portugal. Bull IOBC/WPRS 79: 91-99.
- Gonçalves, M.A. & Afonso, P.B. 2008. Pragas e doenças do olival - Resultados do projecto AGRO 802 “Coberturas do solo no olival em produção biológica e convencional. Estabelecimento de campos de demonstração”, Edição FERN/UAlg, Faro. 38 p.
- Pereira, J.A., Santos, S., Baptista, P. & Bento, A. 2015. Mosca da azeitona: conhecer a praga para melhor lidar com ela. Vida Rural. [www.vidarural.pt/insights/mosca-da-azeitona](http://www.vidarural.pt/insights/mosca-da-azeitona)

## Quadros e Figuras

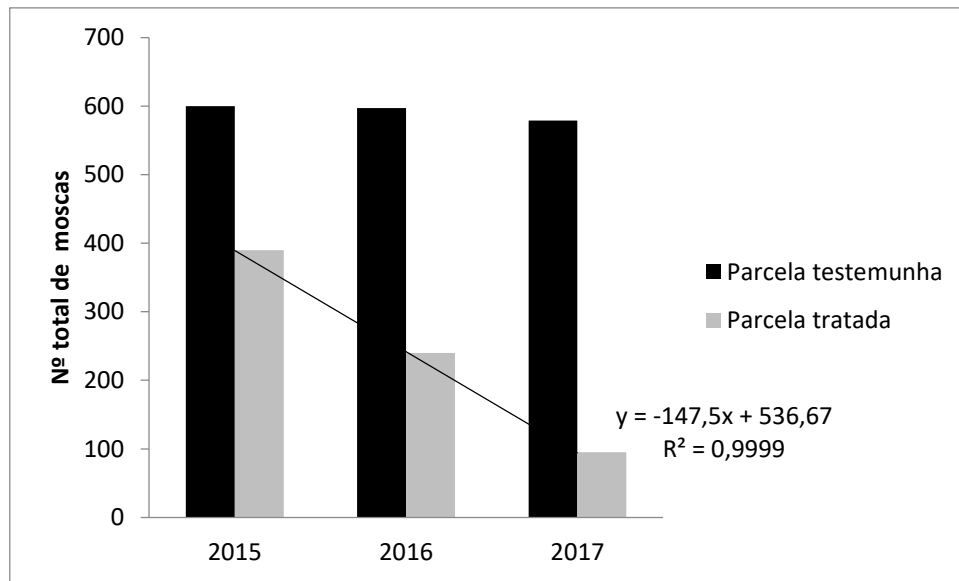
**Figura 1-** Esquema do ensaio no olival (Alcoutim).



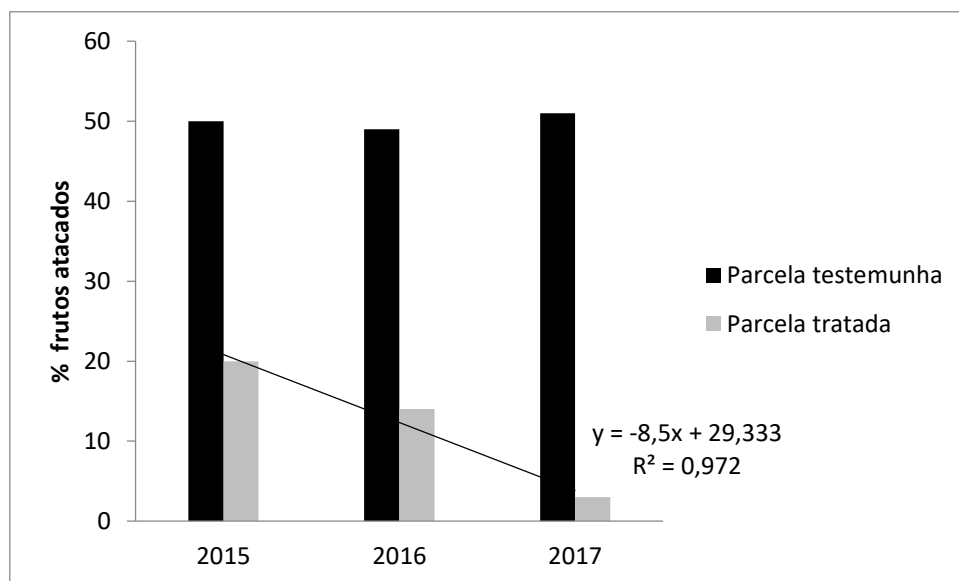
**Figura 2-** Número total de exemplares de mosca-da-azeitona capturado nas seis armadilhas tipo “Olipe”, na parcela do olival sujeita à captura em massa (parcela tratada), nos três anos de observação. Linha de tendência e respectivo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).



**Figura 3-** Número total de exemplares de mosca-da-azeitona capturado nas cinco armadilhas sexuais (armadilhas cromotrópicas adesivas de cor amarela com feromona sexual), em cada parcela do olival, nos três anos de observação. Cinco armadilhas sexuais em cada parcela. Linha de tendência e respectivo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na parcela sujeita à captura em massa (parcela tratada).



**Figura 4-** Número total de exemplares de mosca-da-azeitona capturado nos copos mosqueiros (armadilhas Tepri), em cada parcela do olival, nos três anos de observação. Cinco copos mosqueiros em cada parcela. Linha de tendência e respectivo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na parcela sujeita à captura em massa (parcela tratada).



**Figura 5-** Percentagem de frutos atacados pela mosca da azeitona, em cada parcela do olival, nos três anos de observação. Linha de tendência e respectivo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na parcela sujeita à captura em massa (parcela tratada).

## **Sessão III – Sistemas e Técnicas Culturais**

## **Oliveira, a antiga arte de não morrer de fome nem de sede: estudos no Baixo Alentejo**

Maria Isabel Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Superior de Agronomia (ISA), Universidade de Lisboa (ULisboa), Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, DCEB, LEAF, isabelferreira@isa.ulisboa.pt

### **Resumo**

O fecho dos estomas como reacção à carência hídrica constitui uma ferramenta de controlo das perdas de água, contribuindo para a parcimónia no consumo e sobrevivência da planta. Porém, tem como consequências não só a redução das trocas por fotossíntese e consequente produção de foto-assimilados, como a redução do necessário arrefecimento evaporativo das folhas. Trata-se de uma difícil equação em ambientes adversos como os de muitas regiões de clima mediterrânico ou semiárido com algumas respostas de ordem anatómica a nível foliar. Ensaio em vários olivais na região de Beja sugerem que outra estratégia para gerir a escassez de água, como a do aumento dos recursos hídricos pelas oliveiras, é importante neste contexto edafo-climático, muito contribuindo para que sobrevivam e produzam. Trata-se da expansão e dinâmica do sistema radicular, em que os resultados experimentais são consistentes em três diferentes aspectos que ilustram esta capacidade. Primeiro, o seguimento da absorção radicular durante três anos, por meio da análise da dinâmica da água no solo sugere uma colonização do solo extensa no plano horizontal. Segundo, os resultados da medição de fluxo de seiva em raízes, em direcções opostas, usando métodos independentes, sugerem não só a exploração extensa também no plano vertical, nos dois casos para além da evidência obtida por observação visual directa, como o papel da redistribuição hidráulica como estratégia de gestão. Em terceiro lugar, estimativas do balanço hídrico do solo a partir do teor de água no solo, em confronto com as medições do uso da água, sugerem uma extensão do sistema radicular acima do que é frequentemente considerado em modelação. Este facto é corroborado pelo valor dos parâmetros das funções de stress obtidas, que se afastam dos sugeridos em alguns manuais. Consumo moderado, redução moderada da condutância estomática sobretudo em comportamento iso-hídrico são outras características que contribuem para o sucesso.

**Palavras-chave:** *Olea europaea*, Mediterrâneo, sobrevivência, sistema radicular, modelação.

### **Abstract**

Stomatal closure contributes to reduce water use improving plant survival capacities. Notwithstanding, this is at the cost of a reduction in photosynthesis and in leaf temperature control. During dry, hot Mediterranean summer seasons, some solutions at leaf level for this difficult compromise are related with reducing radiation interception and increasing sensible heat diffusion, for instance by developing small leaf size, high leaf reflectance and adapted positions towards sunlight. Another order of survival strategies concerns the increase of water uptake at root level. Several experiments were performed to study the roots behaviour in a rainfed olive orchard under the harsh summer conditions of South East Portugal (Alentejo region). These experimental studies provided evidence on how the size and dynamics of the root system contribute in different aspects to cope with summer water scarcity. The results are consistent in three aspects that



illustrate this capacity in olive trees. First, the follow-up of root water uptake during three summers suggested the uniform colonization of the inter-row space in horizontal direction. Second, sap flow measured in roots in opposite directions, with two independent methods, provided evidence of deep root exploitation, at lower levels than visual direct observation indicated. These results also illustrated the qualitative and quantitative importance of hydraulic redistribution. Third, water balance estimates from soil water content, compared with plant water use measured by micrometeorological approaches such as eddy covariance, also suggest that root system exploits deeper layers than the ones usually considered in modelling. This cultivar and stand displayed a reduced water use and an earlier but moderate reduction in stomatal conductance. These facts are consistent with the need to adapt the parameters considered in current manuals for irrigation scheduling, for the stress coefficient function.

**Keywords:** *Olea europaea*, Mediterranean, survival, root system, modelling

### **Introdução**

Como em qualquer balanço, quando a oferta e a procura não se igualam, há uma variação de armazenamento no volume de controlo. Nas plantas, este princípio aplica-se ao seu próprio balanço de água, com entradas pela absorção de água, sobretudo pelas raízes, e saídas, sobretudo pelas folhas. Em condições adversas, como as que ocorrem quando a disponibilidade de água pela absorção radicular não coincide com a sua utilização pela transpiração (clima mediterrânico), há variação de armazenamento de água nos órgãos das plantas. Esta variação corresponde em geral a pequenos volumes de água face aos mobilizados diariamente, e tem expressão sobretudo à escala horária, num ritmo circadiano, não mobilizando quantidades importantes à escala sazonal, como os registos de variação do diâmetro do tronco sugerem (Ferreira et al., 2012b e dados não publicados). Consequentemente, e pese embora a importância estratégica, a meio do dia, da mobilização das reservas internas da planta, na escala temporal do estio, estas sobrevivem e produzem gerindo um equilíbrio que se pode conseguir pela redução do consumo e/ou pelo aumento da absorção de água.

Se, nas perdas de água, a parte aérea é protagonista, estando esta componente do balanço razoavelmente bem estudada pela acessibilidade da parte visível da planta e atmosfera envolvente, já a absorção está insuficientemente estudada, sobretudo em plantas como as oliveiras, em parte devido ao seu profundo sistema radicular, a metade escondida (“hidden half”).

Neste contexto, iniciaram-se em 2010, alguns estudos em olivais do Alentejo, numa das zonas de Portugal em que a carência hídrica tem sido mais crítica, no âmbito de um projecto que visava compreender estratégias de sobrevivência em olival, em especial o papel do sistema radicular (WUSSIAME). Esses estudos, englobando outras vertentes, deram particular importância ao papel da redistribuição hidráulica (RH).

Pela primeira vez a nível mundial, foram aplicados métodos de medição de fluxo de seiva em raízes de oliveiras, capazes de avaliar a RH, isto é, com sensores que permitissem medir fluxos em sentidos opostos. Por uma questão de verificação independente, utilizaram-se dois métodos totalmente diferentes, um dos quais foi desenvolvido especificamente e publicado no âmbito deste estudo (Ferreira et al., 2018).

Com base nos resultados deste e de outros projectos anteriores, está em curso um outro projecto que, mediante ensaios complementares e um trabalho de síntese e de modelação, tem permitido dar mais alguns passos na compreensão da RH e suas implicações. Pretende-se fazer um balanço destes trabalhos na perspectiva da

compreensão do funcionamento do olival em condições hídricas adversas. Os resultados aqui referidos já foram publicados por temas individualizados, mas é inovadora a síntese que permite fazer uma análise conjunta sobre a importância da absorção radicular nas condições estudadas.

### **Materiais e Métodos**

As experiências foram realizadas de 2010 a 2012, em olivais localizados no Alentejo (Portugal), região de Beja: um em regime intensivo (Arbequina), com 7 anos (2011), índice de área foliar entre 1,0 e 1,3, em função do crescimento e podas, cerca de 17% de percentagem de cobertura, regado por gota-a-gota, e um tradicional, de sequeiro (Cobrançosa), com 21 anos, índice de área foliar semelhante ao olival de regadio (ca. 1 em 2010), cerca de 37% de percentagem de cobertura (Häusler et al., 2014). No olival regado, um ciclo de stress foi induzido em 2011, por 6 semanas, tendo a evapotranspiração (ET) e transpiração (T) sido medidas (Conceição et al., 2017b) e tendo a ET relativa, para a estimativa do coeficiente de stress, avaliada através de sensores de fluxo de seiva, o que permitiu estabelecer uma função de stress (Ferreira et al., 2012b).

Para a análise da dinâmica da absorção radicular usaram-se medições do teor de água no solo feitas com sonda de neutrões em tubos dispostos na parcela regada (Ferreira et al., 2012b) e na parcela de sequeiro (Conceição et al. 2018) e, por outro lado, usaram-se medições do fluxo de seiva em raízes, para cujo efeito se instalaram sensores pelo método da deformação do campo de temperaturas (*Heat Field Deformation Method* HFDM, Nadezhdina et al., 2014) e pelo método de impulsos de calor compensado (*Calibrated Average Gradient*, CAG, Green et al 1997; Green et al 2003, Testi and Villalobos, 2009) com uma modificação específica descrita no anexo técnico de Ferreira et al. (2018).

Os resultados da aplicação destes métodos independentes de medição dos fluxos em raízes no olival de sequeiro foram apresentados em publicações específicas, além das acima referidas, ainda em Ferreira et al. (2013) para o HFDM, e Ferreira et al. (2012a) para o método CAG modificado, restringindo-se o presente artigo a uma análise integradora na perspectiva acima descrita.

### **Resultados e Discussão**

Tratamos aqui da expansão e dinâmica do sistema radicular, analisada directa e indirectamente, em que os resultados experimentais são consistentes em três diferentes aspectos que ilustram esta capacidade e que se descrevem como A, B e C.

Em primeiro lugar (A), o seguimento da absorção radicular durante três anos, por meio da análise da dinâmica da água no solo sugere uma colonização do solo extensa no plano horizontal. Em diferentes anos de observação com características muito diferentes em termos de balanço hídrico foram atingidos valores mínimos de teor de água no solo semelhantes (camada 0 – 1,2 m) no olival de sequeiro. Pensamos que tal se deve ao facto de as árvores estarem a explorar, com maior ou menor intensidade, camadas inferiores após esgotamento das que estão acima de 1,2 m. Por outro lado, observando a água disponível, na média ( $n = 4$ ) das oito profundidades, e três distâncias à árvore, verificamos que não há diferenças significativas de absorção radicular entre as três localizações no plano horizontal, o que sugere uma exploração extensa e relativamente uniforme na direcção horizontal.

Por outro lado, pela observação directa das raízes no olival de sequeiro (trincheiras), concluímos também que estas colonizam o solo com uma distribuição horizontal homogénea nos horizontes *solum* (Ap and Bt), com abundantes raízes largas,

médias e finas ( $< 1$  mm), o que é consistente com a análise da absorção radicular. Raízes largas estavam ausentes abaixo do *solum* (horizonte Ck, 0,7- 3,0 m) onde apareciam apenas raízes finas e muito finas. A conjugação destas observações permite deduzir o importante papel das raízes finas na exploração de um alargado volume de solo.

Em segundo lugar (B), os resultados da medição de fluxo de seiva em raízes, em direcções opostas, por dois métodos independentes acima referidos, sugerem também a exploração extensa no plano vertical, nos dois casos para além da evidência obtida por observação visual directa, o que está relacionado e se explica em parte pelo outro aspecto observado: a redistribuição hidráulica como estratégia de gestão.

Como já descrito (Ferreira et al. 2012a, 2013; Nadezhdina et al., 2014) observou-se em olival um efeito “elevador”: enquanto a meio do dia, a água sobe sempre das raízes profundas para a parte aérea, durante toda a noite e no início e final do dia, parte da água absorvida pelas raízes profundas dirige-se para as raízes superficiais e destas para o solo, na direcção contrária ao “normal”, por um mecanismo em que o fluxo de água se dá no sentido do potencial total de água mais baixo, segundo a lei de Darcy.

A meio do dia, quando o potencial mais baixo está na atmosfera, as pequenas quantidades de água que o solo recebeu poderão alimentar a mobilização de nutrientes das raízes superficiais para a parte aérea, no sentido habitual. Assim que recomeçaram as chuvas, no Outono, esta dinâmica foi alterada rapidamente, havendo movimentação de água através das raízes superficiais para as raízes profundas, mesmo antes que houvesse tempo para chegar água por infiltração e posterior movimento no solo para essas camadas mais profundas.

De uma forma geral, foram exploradas outras hipóteses interpretativas para as observações, como: absorção foliar de água durante a noite, redistribuição horizontal no solo. Porém, pela análise da dinâmica de água no solo, da humidade atmosférica e de outros dados, estas hipóteses foram descartadas. A interpretação da redistribuição vertical é reforçada pelo facto de, mesmo na estreita faixa onde o teor de água no solo era medido, haver diferenças significativas do teor em água entre o solo superficial (0,2 m) e medianamente profundo (1,20 m).

Em termos qualitativos os dois métodos forneceram um quadro consistente. Porém com o método CAG modificado foi possível uma quantificação. Os fluxos em sentido inverso ocorreram em 30% das noites de Verão e corresponderam em média a 2,6% do fluxo total diário, aumentando desde 1% no início do estio até cerca de 5% no final (Ferreira et al., 2018), o que será uma estimativa conservativa, já que muitas raízes superficiais são relativamente finas, não permitindo a instalação de sensores, sendo assim esta apreciação quantitativa eventualmente subestimada.

Em terceiro lugar (C), as estimativas do balanço hídrico do solo a partir do teor de água no solo, em confronto com as medições do uso da água, sugerem também uma extensão do sistema radicular acima do que é frequentemente considerado. Restringindo-nos à comparação de consumos em relação às dotações de rega, registaram-se no olival intensivo (Junho até Agosto) valores de transpiração variando entre 2 e 4 mm/dia (2010, 2011) e 1 e 2 mm/dia (2012), enquanto as dotações de rega médias foram de 1,3; 1,4 e 1,7 mm/dia (2010, 2011, 2012, respectivamente). Verificámos que a água aplicada foi genericamente inferior ao consumo, mesmo considerando apenas a componente transpiratória. Saliente-se, por exemplo, que a reserva de água no solo na zona aparentemente explorada pelas raízes no olival regado (até onde foram feitas observações directas), mesmo em anos normalmente chuvosos (2010 e 2011) não pareceu ser suficiente para justificar a diferença entre uso da água e dotações de rega, sugerindo que as plantas exploram camadas mais profundas.

Este facto é corroborado pelo valor dos parâmetros das funções de stress ( $K_s$  versus déficit de água no solo) obtidas, que se afastam dos sugeridos em alguns manuais. Concretamente, ao comparar a função de stress obtida experimentalmente (Ferreira et al., 2012b) com as que são obtidas por simulação (Ferreira, 2017), conclui-se que o ajustamento das curvas obtidas por modelação, às observadas experimentalmente, só é possível usando parâmetros do solo e sistema radicular muito díspares dos que seriam sugeridos pela consulta dos valores normalmente atribuídos à profundidade radicular e ao déficit permissível nesta cultura.

Concretizando, e continuando a referir o modelo proposto em Allen et al. (1998) para a função de stress, para o déficit permissível ( $p$ ) obteve-se 0,05 enquanto nos manuais se recomenda o valor de 0,7. Por outro lado, ao testar os valores da reserva útil (RU) no solo que possibilitam uma aderência do modelo às observações experimentais, também para o olival regado analisado, encontra-se um valor de 350 mm para RU, o que pressupõe uma profundidade radicular e uma colonização no plano horizontal bem acima das expectativas, considerando a anisotropia aparente e o tipo de solo e sistema de rega.

A curva de  $K_s$  observada também sugere que a transpiração é pouco afectada pelo stress hídrico, quando se usa a função de stress com base nos valores do potencial foliar de madrugada (potencial de base). A redução na transpiração foi de cerca de 20% para um valor do potencial de base de -1,2 MPa, enquanto nas outras espécies usadas para comparação (pessegueiro e vinha, cf Ferreira, 2017) as reduções foram de cerca de 80%, para idênticos valores do estado hídrico das plantas, quantificado dessa forma.

Os valores relativamente baixos do coeficiente cultural basal ( $K_{cb}$ ), de cerca de 0,4 (Conceição et al., 2017a) significam um consumo moderado, mas não é neste aspecto que a oliveira parece distinguir-se de outras árvores fruteiras em que se têm observado valores próximos de 0,5 (e.g. para pessegueiro, Paço et al, 2004). Concluimos assim que parece ser no aumento da absorção de água que esta espécie é particularmente notável.

Um consumo moderado, uma redução moderada da condutância estomática sobretudo em condições de comportamento iso-hídrico, além de características anatómicas das folhas, pequenas e reflectoras, para respectivamente aumentar a dissipação convectiva e diminuir a absorção de radiação, são outros aspectos que contribuem para a conhecida resiliência da oliveira face ao stress hídrico.

## Conclusões

As oliveiras observadas apresentam um consumo de água baixo mas parece ser a estratégia de aumento dos recursos hídricos proporcionados pela anatomia e funcionamento das raízes que permite distinguir esta espécie, neste contexto edafo-climático, muito contribuindo para que estas árvores sobrevivam e produzam, como foi demonstrado em várias vertentes. Os resultados são consistentes no sentido de uma colonização muito profunda e muito alargada horizontalmente, mesmo em olival regado.

Compreendida a dinâmica e importância da RH, afigura-se que os cobertos em que ocorre RH, que são sobretudo os de sequeiro, podem apresentar vulnerabilidade a um decréscimo da disponibilidade ao nível freático, por práticas de rega que comprometam a qualidade/quantidade da água dos aquíferos ou por outros usos em competição com a agricultura. Já que, compreensivelmente, pomares tradicionais têm sido substituídos por pomares regados de maior produtividade mas eventual maior vulnerabilidade à escassez de água, tais cenários devem ser analisados num quadro de alterações climáticas com perspectivas de limitadas disponibilidades hídricas no futuro.

## Agradecimentos

A Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) co-financiou as experiências a que este estudo reporta, através da bolsa SFRH/BD/66967/2009 (Nuno Conceição) e do Projecto WUSSIAAME (PTDC/AACAMB/10063) - *Uso da água, estratégias de sobrevivência hídrica e impacto de agroquímicos nos recursos hídricos em ecossistemas agrícolas mediterrânicos* e finalmente do Projecto Water Saving in Agriculture (WASA, ERANETMED / FCT): *Technological developments for the sustainable management of limited water resources in the Mediterranean area*, num dos seus objectivos, o de completar os estudos com ensaios complementares e a análise secundária de séries de dados próprios e outros (meta-análise). Os ensaios a que esta síntese reporta foram desenvolvidos em colaboração com vários colegas e estudantes em graduação e em pós-graduação, co-autores das publicações referidas.

## Referências

- Conceição N, Tezza L, Lourenço S, Häusler M, Boteta L, Pacheco CA, Ferreira MI. 2018. Importance of very fine roots in deep soil layers for the survival of rainfed olive trees. *Acta Hortic.* 1199, 57-62. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1199.9, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1199.9>
- Conceição N, Tezza L, Häusler M, Lourenço S, Pacheco CA, Ferreira MI. 2017a. Three years of monitoring evapotranspiration components and crop and stress coefficients in a deficit irrigated intensive olive orchard. *Agricultural Water Management*, 191: 138-152; <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2017.05.011>
- Conceição N, Häusler M, Lourenço S, Pacheco CA, Tezza L, Ferreira MI. 2017b. Evapotranspiration measured in a traditional rainfed and an irrigated intensive olive orchard during a year of hydrological drought. *Acta Hortic.* 1150: 281-288. DOI:10.17660/ActaHortic.2017.1150.39
- Ferreira MI, Conceição N, Pacheco CA, Green S. 2012a. O que fazem as oliveiras de noite ou redistribuição hidráulica num olival de sequeiro no Alentejo. *Actas do VI Simpósio Nacional de Olivicultura* (Mirandela, 15-17 Novembro 2012), pp 67-76. Url:<https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5719/1/REP-I.Ferreira-Actas%20Portuguesas%20de%20Horticultura%20n.%2021.pdf>
- Ferreira MI, Conceição N, Pacheco CA, Häusler M 2012b. Análise de indicadores de desconforto hídrico durante ciclos de stress num olival intensivo no Alentejo. *Actas do VI Simpósio Nacional de Olivicultura* (Mirandela, 15-17 Novembro 2012), pp 207-216. Url: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5722/1/REP-T.A.Paco2-Actas%20Portuguesas%20de%20Horticultura%20n.%2021.pdf>
- Ferreira MI, Conceição N, David TS, Nadezhdina N. 2013. Role of lignotuber versus roots in the water supply of rainfed olives. *Acta Hortic.* 991:181-188. [http://www.actahort.org/books/991/991\\_22.htm](http://www.actahort.org/books/991/991_22.htm)
- Ferreira MI. 2017. Stress Coefficients for Soil Water Balance Combined with Water Stress Indicators for Irrigation Scheduling of Woody Crops. *Horticulturae* 2017, 3(2), 38; <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020038>
- Ferreira MI, Green S, Conceição N et al. 2018. Assessing hydraulic redistribution with the compensated average gradient heat-pulse method on rain-fed olive trees. *Plant and Soil* 425: 21. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3585-x>
- Green SR, Clothier BE, McLeod DJ. 1997. The response of sap flow in apple roots to localised irrigation. *Agric. Water Manage.* 33: 63–78.

- Green SR, Clothier BE, Jardine BJ. 2003. Theory and practical application of heat pulse to measure sap flow. *Agronomy Journal* 95: 1371-1379.
- Häusler M, Ferreira MI, Conceição N. 2014. Assessment of Vegetation Parameters in Olive Trees in the Region of Alentejo. 2013. A Comparison of Direct and Indirect Methods. VII Int. Symp. on Irrigation of Horticultural Crops. Geisenheim, July 2012. *Acta Hortic.* 1038: 407–414. [http://www.actahort.org/books/1038/1038\\_49.htm](http://www.actahort.org/books/1038/1038_49.htm).
- Nadezhdina N, Ferreira MI, Conceição N, Pacheco C, Häusler M, David T. 2014. Water uptake and hydraulic redistribution under a seasonal climate: long-term study in a rainfed olive orchard. *Ecohydrology*. <http://dx.doi.org/10.1002/eco.1545>.
- Paço TA, Conceição N, Ferreira MI. 2004. Measurements and estimates of peach orchard evapotranspiration in Mediterranean conditions, *Acta Hortic.* 664 (2004) 505–512.
- Testi L and Villalobos L. 2009. New approach for measuring low sap velocities in trees. *Agric. and Forest Meteor.* 149(3-4): 730-734.

## Resposta de oliveiras jovens à aplicação de macro e micronutrientes

Cristina Sempiterno<sup>1</sup>, Rui Fernandes<sup>1</sup>, Paula Scotti<sup>2</sup>, José Semedo<sup>2</sup>, Luisa Peixoto<sup>1</sup>, Isabel Pais<sup>2</sup>, Mário Santos<sup>2</sup> & M. Encarnação Marcelo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INIAV, I.P., UEIS-SAFSV/Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva, Tapada da Ajuda, 1300-596 Lisboa, Portugal. cristina.sempiterno@iniav.pt; rui.fernandes@iniav.pt; luisa.peixoto@iniav.pt; encarnacao.marcelo@iniav.pt

<sup>2</sup> INIAV, I.P., UEIS-BRG/Laboratório de Fisiologia Vegetal, Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal. paula.scotti@iniav.pt; jose.semedo@iniav.pt; isabel.pais@iniav.pt; mario.santos@iniav.pt

### Resumo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da carência de macro e micronutrientes (azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre e boro) sobre alguns parâmetros relativos ao desenvolvimento de oliveiras jovens. Em 2013 foi instalado um ensaio em vasos do tipo subtrativo, em ambiente condicionado, com plantas da cultivar Cobrançosa. O ensaio foi delineado em blocos completos casualizados com quatro repetições, tendo sido considerados onze tratamentos experimentais: uma testemunha com adubação completa e dez tratamentos, a cada um dos quais se suprimiu um dos nutrientes em estudo. Entre 2014 e 2017 foram efetuadas medições periódicas de parâmetros morfológicos como o comprimento dos ramos e o diâmetro do tronco, e de parâmetros fisiológicos relacionados com a atividade fotossintética, como a taxa de fotossíntese líquida, a condutância estomática e os teores de clorofilas (SPAD). As observações dos parâmetros fisiológicos foram efetuadas na primavera e no outono. Nos últimos dois anos avaliou-se também a produção de frutos. Os resultados obtidos revelam que o tratamento sem azoto apresentou, ao longo do período experimental, um crescimento dos ramos inferior aos dos restantes tratamentos e um menor aumento do diâmetro do tronco. Foi também no tratamento sem azoto que se registou a mais reduzida quantidade de azeitona produzida. Este tratamento apresentou, ainda, os valores de SPAD mais baixos, indicando teores de clorofila menores, mas a redução da taxa de fotossíntese líquida apenas se observou no outono. Todavia, os valores mais baixos desta taxa foram registados no tratamento sem fósforo, nas duas épocas consideradas. Os resultados comprovam a importância do azoto nas funções associadas ao desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das árvores jovens de oliveira e mostram que o fósforo tem um papel importante no desempenho fotossintético ao longo do ciclo.

**Palavras-chave:** azoto, fertilização, fósforo, fotossíntese, *Olea europaea* L.

### Abstract

The objective of this study is to evaluate the effect of macro and micronutrients deficiencies (nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, iron, manganese, zinc, copper and boron) on some parameters related to the development of young olive trees. In 2013, a trial pot of subtractive type was installed in conditioned environment, with plants of the cultivar Cobrançosa. The trial pot was designed into complete randomized blocks with four replications, and eleven experimental treatments were considered: one control with complete fertilization and ten treatments, each of which without one of the nutrients under study. Between 2014 and 2017, periodic measurements of morphological parameters such as the length of branches and stem diameter, and

physiological parameters related to photosynthetic activity, such as net photosynthesis rate, stomatal conductance and chlorophyll content (SPAD) were performed. Physiological parameters were measured in spring and autumn. In the last two years, fruit production was also evaluated. The results showed that the treatment without nitrogen had the lowest branches growth and a smaller increase of the stem diameter during the experimental period. Also the nitrogen-free treatment showed the smallest amount of produced olives. This experimental treatment also presented the lowest SPAD values, indicating lower chlorophyll content, but the reduction of the net photosynthesis rate was observed only in autumn. However, the lowest values of this rate were recorded in the experimental treatment without phosphorus, in both the considered observation periods. The results confirm the importance of nitrogen in the functions associated with the vegetative and reproductive development of young olive trees and show that phosphorus plays an important role in photosynthetic performance throughout the cycle.

**Keywords:** fertilization, nitrogen, *Olea europaea* L., phosphorus, photosynthesis

### **Introdução**

A prática da fertilização da oliveira nem sempre é efetuada de forma racional, havendo casos em que esta é considerada uma cultura com reduzidas necessidades em nutrientes, enquanto noutras situações se usam quantidades excessivas em relação às exigências da planta.

A utilização de meios de diagnóstico para avaliar o estado de fertilidade do solo e o estado de nutrição da cultura é essencial para fundamentar as recomendações de fertilização. A observação de sintomatologia específica em determinado órgão da planta, especialmente nas folhas, pode constituir, por seu lado, um importante meio complementar de diagnóstico (Marcelo et al., 2014).

Apesar de se conhecerem alguns aspetos particulares da oliveira observados em situações de desequilíbrios nutricionais no campo (Marcelo et al., 2014), os estudos levados a cabo em condições controladas e contemplando um vasto número de nutrientes permitirão eliminar as limitações que resultam da identificação dos aspetos anómalos associados a outras circunstâncias, como a ocorrência de pragas, de doenças e de condições climáticas adversas e o envolvimento de mais do que um nutriente, entre outras.

Uma nutrição adequada é importante desde os primeiros anos de crescimento das oliveiras porquanto estimula o crescimento vegetativo, o que permite um desenvolvimento radicular e da copa favoráveis à futura frutificação e uma redução da fase juvenil não produtiva (García et al., 1999). Influencia também, em fases mais avançadas, os processos reprodutivos (Rosa, 2003) e, conseqüentemente, a quantidade de azeitona produzida.

De uma forma geral, as deficiências em macro e micronutrientes afetam as trocas gasosas e, assim, o crescimento e o desenvolvimento das culturas, embora diferentes nutrientes possam influenciar aspetos específicos do metabolismo fotossintético. Um efeito comum do stresse nutricional é a redução na capacidade fotossintética devido a alterações na área foliar (Rao e Terry, 2000). O azoto é o principal constituinte do aparelho fotossintético, estando relacionado com a síntese de proteínas e regulação enzimática, bem como com a partição e translocação de fotoassimilados. A deficiência em azoto reduz a expansão foliar pela redução do número de células e do decréscimo do seu volume (Lawlor et al., 1989). Outro nutriente fundamental é o fósforo, uma vez que está envolvido nos processos energéticos das células, na regulação de coenzimas e na partição e translocação de assimilados (Rao e Terry, 2000). Nas plantas com carência de



fósforo, o limbo foliar é reduzido e apresenta com frequência uma coloração verde mais escura que resulta de estrangulamentos na expansão celular e, por consequência, num maior número de células por unidade de superfície de área (Marschner, 1995). Já no que se refere ao potássio, nutriente associado ao equilíbrio osmótico das células, à ativação enzimática e ao metabolismo dos hidratos de carbono (Varennes, 2003), encontra-se também relacionado com os processos de floração, de crescimento da azeitona e de formação do azeite (Fernández-Escobar, 2017).

Para além dos três nutrientes atrás indicados, que são os que mais frequentemente limitam o crescimento vegetal (Varennes, 2003), é importante conhecer quais os efeitos provocados por situações de escassez dos restantes.

Com o presente estudo pretendeu-se avaliar, em condições controladas (ensaio em vasos instalado em estufa), o efeito da carência de nutrientes (azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre e boro) sobre alguns parâmetros relativos ao crescimento e à fisiologia de plantas jovens da cv. Cobrançosa, bem como sobre a manifestação de sintomas anómalos.

## Material e Métodos

Tendo em vista o objetivo do estudo, em 2013 estabeleceu-se um ensaio subtrativo em vasos, delineado em blocos completos casualizados com quatro repetições, tendo sido considerados onze tratamentos experimentais: uma testemunha com adubação completa e dez tratamentos, a cada um dos quais se suprimiu um dos nutrientes em estudo (azoto, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre e boro). O ensaio decorreu em ambiente condicionado no horto de química agrícola “Boaventura de Azevedo”, situado na tapada da ajuda em Lisboa, tendo-se usado oliveiras com cerca de um ano de idade da cultivar Cobrançosa.

A terra utilizada foi retirada da camada de 0 a 0,20 m de um Podzol háplico (PZha), segundo a classificação do IUSS Working Group WRB (2015), localizado na zona de Pegões (38°39'14''N, 08°38'11''W). Trata-se de um solo de reação pouco ácida ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 6,2$ ), com textura arenosa, pobre em fósforo, potássio, magnésio, manganês, cobre e boro ( $<23 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ ,  $37 \text{ mg kg}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$ ,  $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Mg}$ ,  $3,73 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Mn}$ ,  $0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}$  e  $<0,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ B}$ ), com teores médios de zinco ( $1,78 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Zn}$ ) e altos de ferro ( $44,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$ ), com baixo teor de matéria orgânica (0,70%) e muito baixa capacidade de troca catiónica potencial ( $1,4 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ ).

Utilizaram-se vasos *Kick-Brauckman* que se preencheram com 11 kg de terra. Antes do transplante realizou-se a correção da acidez da terra com a aplicação de 1,68 g/vaso de carbonato de cálcio. Durante o ensaio a terra foi mantida a 70% da capacidade de campo, tendo-se usado água desionizada nas operações de rega. Através de operações de rotação dos vasos garantiram-se sempre iguais condições de luminosidade, exposição solar e temperatura. A aplicação das soluções nutritivas, preparadas com reagentes com grau de pureza *pro analyse*, foi realizada a cada dois meses no caso dos macronutrientes e a cada seis meses no caso dos micronutrientes. No Quadro 1 apresentam-se as quantidades de nutrientes aplicadas.

De 2014 a 2017 foi avaliado, anualmente, o comprimento de todos os ramos e sub-ramos (raminhos inseridos nos ramos principais). O diâmetro da base do tronco de todas as árvores foi medido antes de se aplicarem os nutrientes (2013) e também em todos os restantes anos, recorrendo a um paquímetro de alta precisão. A taxa de fotossíntese líquida aparente ( $P_N$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e o índice de SPAD (Soil Plant Analysis Development) foram avaliados em duas épocas por ano, na primavera e no outono. Em 2016 e 2017 foi também contabilizada a produção de azeitona.

A taxa de fotossíntese líquida aparente, a condutância estomática e a transpiração foram determinadas usando um analisador portátil de gás por infravermelhos (IRGA, Infra Red Gas Analyser) em sistema aberto, com uma câmara de 6 cm<sup>2</sup> com sistema integral de luz LED azul-vermelho (Li-Cor 6400, LiCor, Lincoln, USA). As medições foram efetuadas no período da manhã (entre as 9:30 e as 12:30) em folhas adultas expandidas sujeitas a uma radiação fotossinteticamente ativa de 1000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A eficiência do uso da água (WUE) foi calculada como  $P_N / E$ . O índice de SPAD foi determinado com um medidor portátil SPAD-502 (Minolta Camera Co, Osaka, Japan), nas mesmas folhas utilizadas para as determinações das trocas gasosas. As leituras foram realizadas em três pontos distintos da face adaxial das folhas, em três plantas de cada tratamento.

Recorreu-se à análise de variância para avaliar os efeitos dos tratamentos experimentais sobre as diferentes variáveis controladas e ao teste de Duncan ( $p=0,05$ ) para a comparação de médias *a posteriori*. Utilizou-se a análise de regressão para avaliar a resposta de algumas variáveis ao longo do tempo.

## Resultados e discussão

Como se pode observar no Quadro 2, os valores do comprimento dos ramos e sub-ramos registados no tratamento sem azoto, em todos os anos, foram significativamente inferiores ( $p \leq 0,05$ ) aos dos restantes tratamentos experimentais, o que resultou num acréscimo total (diferença entre os valores registados em 2017 e em 2014) igualmente menor. Nos restantes tratamentos experimentais as diferenças foram pouco acentuadas, tendo o crescimento mais elevado sido obtido no tratamento sem magnésio.

Na Fig. 1 pode observar-se a evolução do comprimento total dos ramos ao longo do tempo no tratamento sem azoto e no tratamento com adubação completa. A diferença deste parâmetro entre os dois tratamentos experimentais fez-se sentir logo no primeiro ano após a instalação do ensaio e veio a acentuar-se no decorrer do período experimental.

No Quadro 3 apresentam-se os valores dos diâmetros da base do tronco registados de 2013 a 2017, assim como o acréscimo observado para cada um dos tratamentos experimentais no conjunto dos anos (diferença entre os valores registados em 2017 e em 2013). O tratamento sem azoto apresentou, também, valores deste parâmetro significativamente inferiores ( $p \leq 0,05$ ) a todos os outros tratamentos experimentais. Nas árvores deste tratamento foi ainda possível visualizar uma forte desfoliação. Estes resultados confirmam a importância do azoto como promotor da atividade vegetativa (Noori et al., 2015), influenciando, assim, o crescimento das folhas, dos raminhos e dos troncos.

No tratamento sem azoto registou-se, ainda, uma produção nula de frutos, em 2016, e quase nula (1 g/vaso) em 2017, valores estes significativamente inferiores ( $p \leq 0,05$ ) aos da testemunha e dos restantes tratamentos experimentais, o que corrobora a importância do azoto nos processos de floração e vingamento (Rosa, 2003).

Em relação aos parâmetros fisiológicos, verificou-se, em todos os tratamentos experimentais, que a taxa de fotossíntese líquida aparente ( $P_N$ ) e a condutância estomática ( $g_s$ ) foram sempre mais elevadas na primavera (Quadro 4), correspondendo a um estágio de maior desenvolvimento da cultura (crescimento vegetativo e floração). O mesmo ocorreu com os valores do SPAD, à exceção do observado no tratamento sem azoto.

Nas duas épocas consideradas, os valores mais baixos da  $P_N$  e da  $g_s$  foram registados no tratamento sem fósforo, refletindo o papel crucial deste elemento nos processos fotossintéticos ao longo do ciclo (Marschner, 1995). No outono, embora os valores mais baixos destes parâmetros digam respeito ao tratamento sem fósforo, não

diferem estatisticamente ( $p=0,05$ ) dos valores obtidos nos tratamentos sem magnésio e sem manganês.

Por seu lado, a ausência de aplicação de azoto não afetou a  $P_N$ , a  $g_s$  e a eficiência do uso da água (WUE) registadas na primavera. Pelo contrário, no outono observou-se uma redução da  $P_N$  no tratamento sem azoto em relação ao tratamento com adubação completa.

No que se refere ao SPAD, o tratamento sem azoto apresentou os valores mais baixos, quer no outono quer na primavera, indicando menores teores de clorofila, o que se atribui ao facto de grande parte do azoto das folhas se localizar nas moléculas de clorofila (Evans, 1989). Em oliveiras com carência de azoto, Boussadia et al. (2011) encontraram mesmo uma correlação positiva entre os teores de clorofila e a taxa de fotossíntese, relação que não foi observada no presente trabalho (resultados não apresentados).

O tratamento sem fósforo, apesar da redução da  $P_N$ , foi o que apresentou valores mais elevados de SPAD, refletindo maiores teores de clorofila (Quadro 4) que poderão resultar de um espessamento das folhas (menores valores da razão PF/PS, resultados não apresentados). Efetivamente, uma coloração mais escura das folhas foi associada à carência de fósforo devido a constrangimentos na expansão celular que resultam num maior número de células por unidade de área foliar (Marschner, 1995).

Embora o tratamento sem potássio não tenha diferido significativamente ( $p>0,05$ ) do tratamento com adubação completa em nenhum dos parâmetros atrás considerados, observaram-se sintomas típicos da deficiência de potássio, ou seja, as folhas apresentaram uma coloração amarelada que evoluiu para necrose apical ou marginal das folhas com acentuada separação com o resto do limbo verde. Este aspeto inicia-se nas folhas mais velhas, podendo evoluir para as folhas mais jovens, tal como foi descrito por Marcelo et al. (2014).

Observou-se, ainda, que o peso unitário da azeitona do tratamento sem potássio (1,7 g) foi, em 2017, significativamente inferior ( $p\leq 0,05$ ) ao do tratamento com adubação completa (3,2 g), não obstante a produção de azeitona deste dois tratamentos experimentais não ter diferido significativamente ( $p=0,05$ ) entre si. Considera-se que este comportamento estará associado à maior exigência da planta em potássio na fase de crescimento do fruto (Fernández-Escobar, 2017).

Nas condições do ensaio, os resultados denotam uma forte resiliência da atividade vegetativa e fotossintética das oliveiras à carência dos nutrientes estudados, exceto no caso do azoto e do fósforo. Em relação ao potássio, a ausência da sua aplicação refletiu-se, sobretudo, no pequeno crescimento do fruto.

## **Conclusões**

Os resultados obtidos neste estudo permitem confirmar a relevância do azoto nas funções associadas ao desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das árvores jovens de oliveira e mostram que o fósforo tem um papel importante no desempenho fotossintético ao longo do ciclo. No caso do potássio, destacam-se a presença de sintomas característicos de carência e a confirmação da sua influência nos processos associados ao crescimento da azeitona.

A ausência de resposta por parte dos restantes nutrientes poderá ser explicada pelo facto de, no período em estudo, as plantas de oliveira terem sido eficientes na utilização desses nutrientes, mesmo que existentes em pequenas quantidades na terra utilizada, admitindo-se que a continuação do ensaio permitirá o aparecimento de sintomas reveladores de carências.

**Referências**

- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Ben El Hadj, S., Braham, M., Lemeur, R. & Van Labeke, M.C. 2011. Nondestructive determination of nitrogen and chlorophyll content in olive tree leaves and the relation with photosynthesis and fluorescence parameters. *Photosynthetica* 49 (1): 149-153.
- Evans, J.R. 1989. Partitioning of nitrogen between and within leaves grown under different irradiance. *Aust. J. Plant Physiol.* 16: 533-548.
- Fernández-Escobar, R. 2017. Fertilización. p. 420-460. In: D. Barranco, R. Fernandez-Escobar e L. Rallo (eds.), *El Cultivo del Olivo*, 7ª ed. Madrid.
- García, J.K., Liñán, J., Sarmiento, R. & Troncoso, A. 1999. Effects of different N forms and concentrations on olive seedlings growth. *Acta Hort.* 474: 323-327.
- IUSS Working Group WRB, 2015. *World Reference Base for Soil Resources 2014*. Update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Report 106, Roma. <http://www.fao.org/3/a-i3794e.pdf>
- Lawlor, D.W., Kontturi, M. & Young, A.T. 1989. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *J. Exp. Bot.* 40: 43-52.
- Marcelo, M.E., Calouro, F. & Jordão, P.V. 2014. Fertilização. p. 111-129. In: INIAV, I.P. (ed.), *Boas Práticas no Olival e no Lagar*.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2<sup>nd</sup> Ed. 889, Academic Press, London.
- Noori, O., Arzani, K., Moameni, A. & Taheri M. 2015. Vegetative growth and fruit set of olive (*Olea europaea* L. cv. 'Zard') in response to some soil and plant factors. *J. Central European Agriculture* 16 (3): 319-329.
- Rao, I.M. & Terry, N. 2000. Photosynthetic adaptation to nutrient stress. p. 379-397. In: M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty (eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor & Francis, London.
- Rosa, M.M. 2003. Efeito da fertilização azotada na qualidade da flor e no vingamento da azeitona 'Blanqueta de Elvas'. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agronómica. UTL/ISA, Lisboa.
- Varenes, A. 2003. *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar Editora, Lisboa.

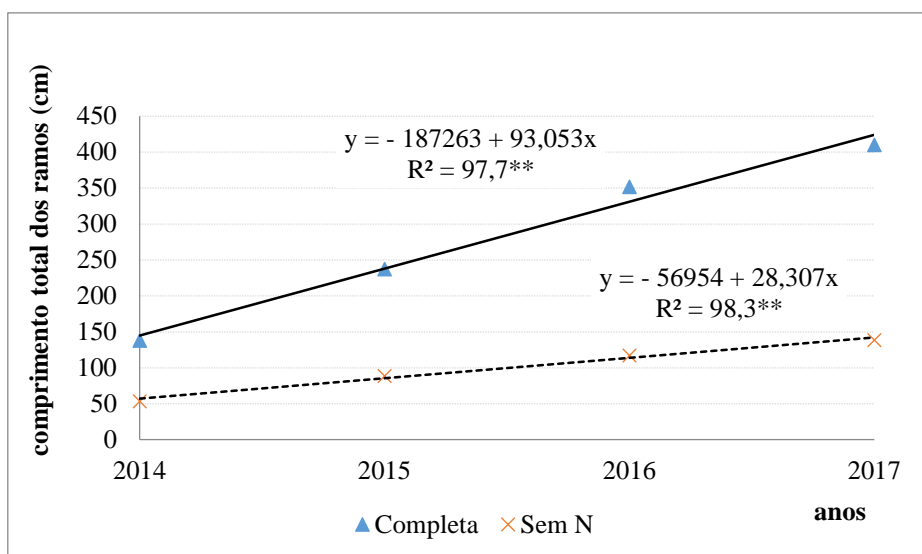
**Quadros e Figuras****Quadro 1** – Quantidade de nutrientes aplicados por ano (mg/vaso).

	2013 a 2015	2016 a 2017
N	269	656
P	75	183
K	382	931
Ca	48	117
Mg	76	186
S	111	242
Fe	6,60	16,13
Mn	0,216	0,528
Zn	0,129	0,317
Cu	0,123	0,300
B	0,472	1,152

**Quadro 2** – Valores do comprimento total dos ramos (incluindo sub-ramos) observados entre 2014 e 2017 (mm).

Tratamento	2014	2015	2016	2017	Acréscimo de 2014 a 2017
C	138,2 ab	237,6 ab	352,0 b	410,2 abc	272,0 ab
s/N	53,8 c	88,9 d	117,2 c	138,7 d	84,9 c
s/P	133,7 ab	178,5 c	429,8 a	448,7 ab	315,0 ab
s/K	134,1 ab	232,1 ab	330,1 b	385,2 bc	251,1 ab
s/Ca	132,3 ab	229,9 ab	311,5 b	371,8 c	239,5 b
s/Mg	134,2 ab	200,7 bc	313,9 b	458,1 a	323,9 a
s/Fe	127,1 b	212,7 abc	310,9 b	394,2 abc	267,1 ab
s/Mn	144,3 ab	227,5 ab	343,8 b	382,1 bc	237,9 b
s/Zn	135,9 ab	231,1 ab	338,1 b	389,4 abc	253,5 ab
s/Cu	169,0 a	254,3 a	355,6 b	426,6 abc	257,6 ab
s/B	144,6 ab	232,8 ab	362,1 b	409,0 abc	264,4 ab
sm ( $\pm$ )	11,544	13,695	18,725	21,052	24,022
c.v. (%)	17,6	12,9	11,6	11,0	19,1

sm - desvio padrão da média; c.v. - coeficiente de variação



**Figura 1** – Evolução do comprimento total dos ramos nos tratamentos experimentais adubação completa e sem azoto

**Quadro 3** – Valores do diâmetro da base do tronco observados entre 2013 e 2017 (mm).

Tratamento	2013	2014	2015	2016	2017	Acréscimo de 2013 a 2017
C	4,6 a	10,4 a	12,1 a	13,4 bc	13,8 bc	9,2 c
s/N	4,2 a	7,8 b	8,4 b	8,9 d	9,2 d	5,0 d
s/P	4,4 a	10,5 a	12,1 a	14,7 ab	15,6 ab	11,3 ab
s/K	4,3 a	10,1 a	12,3 a	14,2 abc	14,5 abc	10,1 abc
s/Ca	5,6 a	10,7 a	12,7 a	14,9 ab	15,3 abc	9,8 bc
s/Mg	4,7 a	10,8 a	12,01 a	13,2 bc	13,8 bc	9,1c
s/Fe	4,4 a	9,9 a	11,5 a	12,6 c	13,8 bc	9,4 bc
s/Mn	4,2 a	10,9 a	12,3 a	13,9 abc	14,4 abc	10,2 abc
s/Zn	5,1 a	10,8 a	12,7 a	14,4 abc	15,0 abc	9,9 abc
s/Cu	3,9 a	10,7 a	12,8 a	15,6 a	15,7 a	11,8 a
s/B	4,2 a	10,2 a	12,3 a	13,0 bc	13,7 c	9,5 bc
sm (±)	0,463	0,491	0,503	0,583	0,563	0,604
c.v. (%)	20,6	9,6	8,4	8,6	8,0	12,6

sm - desvio padrão da média; c.v. - coeficiente de variação

**Quadro 4** - Valores de fotossíntese líquida aparente ( $P_N$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), eficiência do uso da água (WUE, calculada como  $P_N/E$ ) e SPAD observados na primavera e no outono entre 2014 e 2017

Tratamento	Primavera				Outono			
	$P_N$	$g_s$	WUE	SPAD	$P_N$	$g_s$	WUE	SPAD
C	11,5 a	184,0 a	3,0 a	81,6 a	9,5 a	72,8 a	3,9 ab	69,2 bc
s/N	10,1 a	156,4 a	3,3 a	53,9 b	7,2 bc	76,4 a	3,2 bc	64,4 c
s/P	7,5 b	106,6 b	3,7 a	87,0 a	5,3 c	39,6 d	4,5 ab	76,5 a

s/K	10,5 a	172,6 a	3,1 a	79,0 a	7,6 ab	68,5 ab	5,6 a	69,5 bc
s/Ca	11,8 a	173,4 a	3,5 a	78,0 a	7,7 ab	66,1 abc	2,2 c	69,9 b
s/Mg	11,0 a	160,8 a	3,4 a	82,1 a	7,0 bc	48,5 cd	4,6 a	68,7 bc
s/Fe	11,0 a	167,8 a	3,4 a	76,5 a	8,9 ab	67,9 ab	3,7 ab	69,4 bc
s/Mn	11,0 a	164,9 a	3,2 a	79,0 a	7,2 bc	50,1 bcd	4,4 ab	72,0 ab
s/Zn	11,2 a	168,4 a	3,3 a	80,4 a	8,3 ab	61,7 abc	4,2 ab	69,1 bc
s/Cu	11,6 a	175,6 a	3,2 a	82,3 a	8,5 ab	69,8 a	4,0 ab	72,1 ab
s/B	11,2 a	177,8 a	3,1 a	81,1 a	7,4 ab	61,9 abc	4,3 ab	71,1 b
sm ( $\pm$ )	0,851	16,863	0,289	4,410	0,650	6,068	0,407	1,635
c.v. (%)	20,2	26,2	22,2	14,4	29,2	33,8	35,5	8,1

$P_N$  ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ );  $g_s$  ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); sm - desvio padrão da média; c.v. - coeficiente de variação

## **Adecuación de aportes de fertilización complementaria en olivar intensivo con riego deficitario controlado**

Gilberto Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Isabel López-Cortés<sup>1\*</sup> & Domingo M. Salazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Departamento Producción Vegetal. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera S/N 46022 Valencia. Spain. \*islocor@upv.es

### **Resumen**

La situación olivícola actual en España es de un claro aumento de la superficie dedicada al cultivo intensivo. Agronómicamente este sistema de cultivo precisa un control mayor, no solo fitosanitario, sino también nutricional, que en algunas ocasiones no se logra con un aporte NPK habitual. Por otra parte, la edad de las explotaciones obliga a un control más exhaustivo con el uso de aplicaciones extra de potasio, aminoácidos y otros microelementos que permitan un mantenimiento mejor de las explotaciones intensivas.

Se plantea el estudio de fertilización extra trabajando en una explotación olivícola de alta densidad con un marco de plantación de  $1.5 \times 3$  m, establecida con el cultivar Arbequina en la zona interior de España, con una climatología de Estepa local, BSk según la clasificación climática Köppen-Geiger. Con una temperatura media de 14.2 °C y una precipitación promedio de 384 mm.

La comparativa de fertilización supletoria se realizó con aportes adicionales de extractos de algas, de nitrato potásico, de potasio adicionado de extracto de algas y de potasio adicionado de aminoácidos aplicados junto con la fertirrigación básica NPK habitual y comparativamente con una línea de riego control solo con aporte de NPK.

Obteniendo una clara diferencia en los tratamientos que combinan el potasio con aminoácidos, seguidos de los tratamientos que combinan la adición de potasio con extractos de algas y únicamente con adición de potasio al abonado básico.

Se observa una diferencia estadísticamente significativa del tratamiento que combina una fertilización potásica con aporte de aminoácidos respecto al resto de tratamientos, siendo los frutos obtenidos de los árboles de este tratamiento de mayores dimensiones y con una mejor relación pulpa/hueso.

Se ha podido comprobar la necesidad de adicionar una fertirrigación suplementaria en potasio, ajustando el momento exacto de su aplicación, no solo en el momento de endurecimiento del hueso y engorde de la aceituna sino también en sus fases iniciales de floración y cuajado.

Se aprecia una mejora en la producción en el caso de la aplicación extra de aminoácidos y potasio sin que esto repercuta en las propiedades organolépticas ni químicas en los aceites obtenidos.

**Palabras-clave:** Olivicultura; Alta densidad; Nutrición; Calidad; Pomología.

### **Abstract**

The current olive growing situation in Spain is a clear increase in the area devoted to high-density cultivation. Agronomically this planting system requires a greater control, not only phytosanitary, but also nutritional, which in some occasions is not achieved with an usual NPK contribution. On the other hand, the age of the farms requires a more exhaustive control with the use of extra applications of potassium, amino acids and other microelements that allow a better maintenance of the high-density systems.



The study of extra fertilization is proposed working in a high-density olive orchard with a planting frame of  $1.5 \times 3$  m, established with the cultivar Arbequina in the interior of Spain, with a local steppe climate, BSk according to the climatic classification Köppen-Geiger. With an average temperature of  $14.2^{\circ}\text{C}$  and an average precipitation of 384 mm.

The comparison of supplementary fertilization was carried out with additional contributions of extracts of seaweed, potassium nitrate, potassium added with seaweed extract and potassium added amino acids applied together with the usual basic NPK fertigation and comparatively with a control treatment only with contribution of NPK.

There is a statistically significant difference in the treatment that combines a potassium fertilization with amino acid contribution compared to the rest of the treatments, the fruits obtained from the trees of this treatment being larger and with a better pulp/bone ratio.

It has been possible to verify the need to add a supplementary fertigation in potassium, adjusting the exact moment of its application, not only at the time of the endocarp hardening and fattening but also in its initial phases of flowering and fruit set.

There is an improvement in production in the case of the extra application of amino acids and potassium without any negative impact on the organoleptic or chemical properties in the olive oils obtained.

**Keywords:** Oliviculture, High-density, Nutrition, Quality, Pomology.

## Introducción

El olivo es un cultivo típicamente mediterráneo, que abarca gran parte de la superficie dedicada a la agronomía en países como España, Italia, Portugal, Grecia o Túnez, entre otros.

Se trata de un cultivo que ha evolucionado a lo largo de los años, pasando del tradicional sistema extensivo con amplios marcos de plantación de  $8 \times 10$  metros, a sistemas de muy alta densidad con marcos de  $1,5 \times 3$  metros, todo ello en busca de una mayor rentabilidad económica mediante el ahorro de costes (Boussadia, 2010).

El hecho de que se haya aumentado la superficie en sistemas de alta y muy alta densidad y que la tendencia se mantenga creciente hasta que se planteen los posibles efectos negativos de este sistema, siendo uno de ellos la contaminación de suelos y acuíferos por el alto impacto de los niveles de fertilización que exigen este tipo de sistemas (Fernández-Escobar *et al*, 2009), en este estudio se plantea comprobar el posible efecto de la sustitución de los tradicionales fertilizantes de origen inorgánico, por compuestos más respetuosos con el medio ambiente, de los denominados bioestimulantes, pretendiendo mantener o mejorar los mismos niveles de producción y calidad organoléptica que con la fertilización inorgánica manejando así los intensivos de una manera más ecológica Chouliaras (2009).

## Material y Métodos

Para llevar a cabo este estudio se han tratado dos filas de 180 olivos del cultivar Arbequina al que se le realizó una caracterización pomológica siguiendo la norma de la Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV-CPVO) del olivo, TG/99/4.

Los tratamientos aplicados fueron el control que se fertirrigó con una solución de NPK como todo el resto de tratamientos, el tratamiento 1 que recibió suplemento de potasio, el tratamiento 2 recibió suplemento de extracto de algas, el tratamiento 3 aportes de fertilización nitropotásica, el tratamiento 4 fertilización con extracto de algas y

suplemento de potasio, se trata por tanto de una combinación de tratamientos (T1 y T2), el tratamiento 5 con fertilización potásica y con aporte suplementario de aminoácidos

Dichos tratamientos se realizaron desde el inicio de la floración hasta final de cuajado de frutos, recibiendo el tratamiento asignado a cada una de las tesis 60 olivos divididos en las dos filas de cultivo donde se realizó el ensayo.

De cada una de las filas de olivos tratados se recolectó manualmente la producción total de dos árboles, siendo estos seleccionados al azar del total de las dos filas sometidas a cada tratamiento.

Con dicha producción se realizó la caracterización pomológica de sus frutos y endocarpios, seleccionando para ello, 100 frutos al azar de cada uno de los tratamientos y tomando medidas de peso, longitud, ancho A y ancho B tanto del fruto como del endocarpio, pudiendo de este modo obtener la relación pulpa/endocarpio.

Además, con la producción restante se realizó la extracción de los aceites de cada tratamiento en planta piloto, para poder analizarlos, tanto químicamente en laboratorio, obteniendo su contenido en ácidos grasos y polifenoles, como organolépticamente, bajo las normas dictadas sobre catas de aceites por el Comité Oleícola Internacional (COI).

## **Resultados y Discusión**

En cuanto al peso y las dimensiones de los frutos se observan diferencias entre los distintos tratamientos fertilizantes aplicados. De este modo, se obtienen los valores máximos en los frutos obtenidos de los árboles tratados con aporte de fertilización potásica y aminoácidos, siendo también diferentes el resto de tratamientos con respecto al control, aunque dependiendo del parámetro que se medía unos obtuvieron mayores valores que otros, ver tabla 1.

La producción por árbol también fue mayor en el caso de los árboles tratados con el aporte extra de potasio y aminoácidos, siendo ésta de más de 7 kilos por árbol, mientras que en el resto de tratamientos se ha mantenido con la producción entre los 5 y 6 kilos por árbol como se muestra en la tabla 2.

Por otro lado, tras analizar en laboratorio el contenido en polifenoles de los aceites, se comprueba que los distintos tipos de fertilización no han influido en el mismo, por lo que no existen diferencias significativas entre los aceites obtenidos de los frutos de cada tratamiento, tal y como se observa en la tabla 3, obteniendo valores similares a los obtenidos por Borges *et al* (2017).

Por último, en el análisis organoléptico de los aceites por método cata siguiendo la norma del COI, no se han observado diferencias entre los distintos tratamientos (figura 3), por lo que se determina que este parámetro en nuestras condiciones no se ve afectado por el tipo de fertilización, al igual que sucede con los estudios de Baldi *et al* (2014) en sus estudios en *Prunus*.

## **Conclusiones**

Se comprueba que se puede mantener los niveles de producción mediante una fertilización más respetuosa con el medio ambiente.

El tratamiento que combina la aportación extra de aminoácidos y potasio supuso una mejora en la producción y rendimiento del cultivo, debido a que aumenta la producción por árbol y las dimensiones y peso individuales de las aceitunas, siendo el único en diferenciarse claramente del control.

El análisis químico de los aceites no se modifica por los distintos tratamientos fertilizantes aplicados.

La caracterización organoléptica de los aceites no se ve afectada por los distintos tratamientos fertilizantes aplicados, lo que implica que se pueden mantener las características del cultivar en los productos obtenidos, suponiendo esto un gran beneficio.

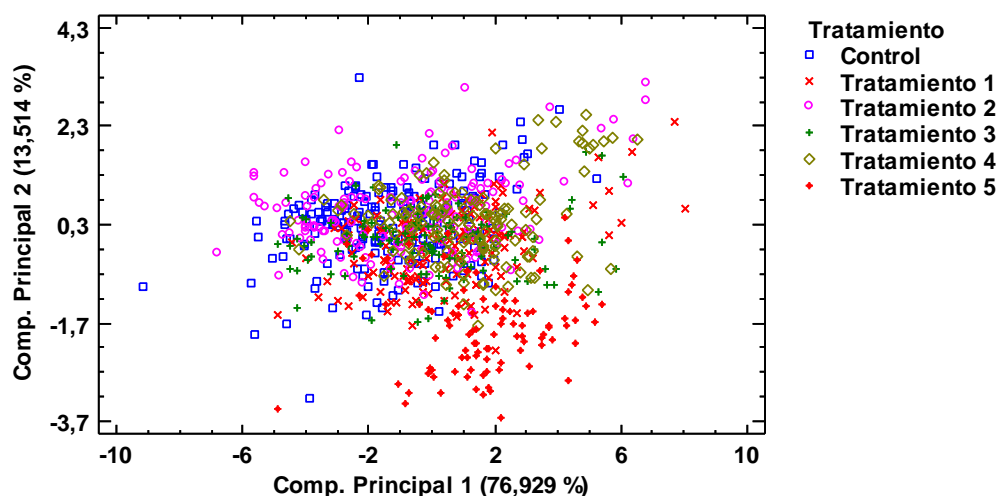
Los tratamientos aplicados no modifican las propiedades organolépticas de los aceites obtenidos, manteniendo las características propias de los aceites monovarietales del cultivar Arbequina.

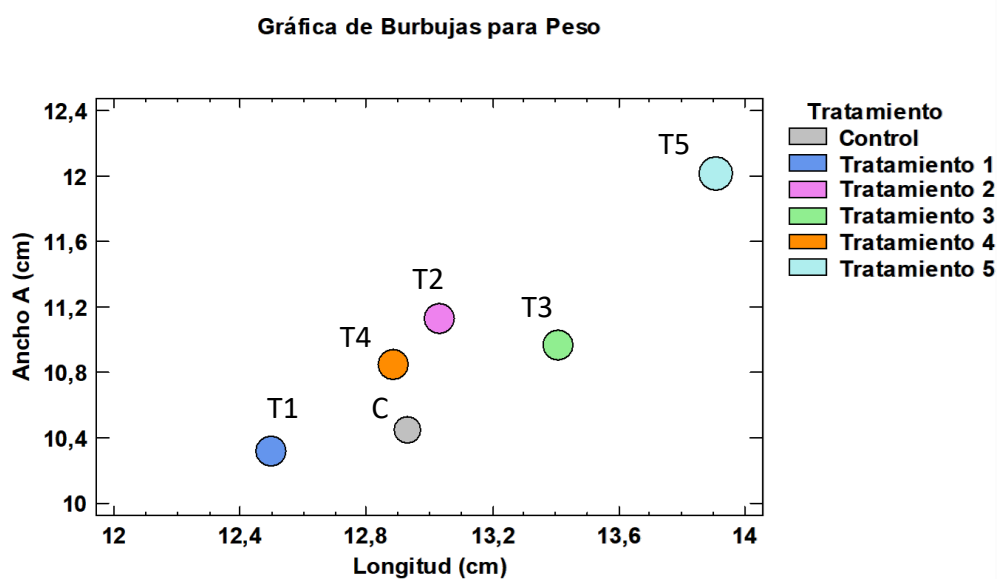
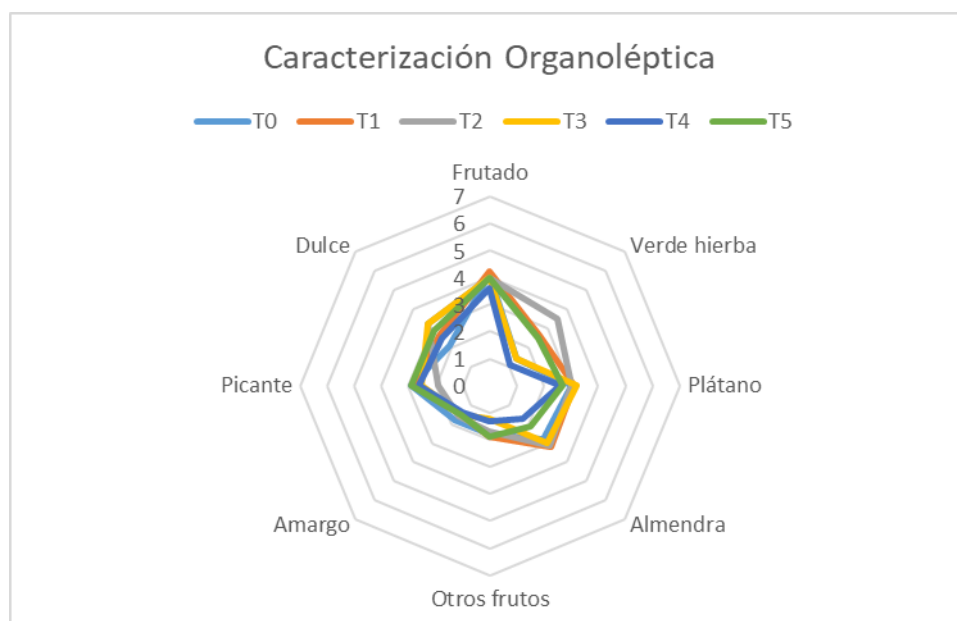
## Referencias

- Baldi E., Marcolini G., Quartieri M., Sorrenti G. & Toselli M. 2014. Effects of organic fertilization on nutrient concentration and accumulation in nectarine (*Prunus pérsica* var. *Nucipersica*) tres: The effect of rate of application. *Scientia Horticulturae*, 179: 174-179.
- Borges T.H., Pereira J.A., Cabrera-Vique C., Lara L., Oliveira A.F. & Seiquer I. 2017. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry*. 215: 454-462.
- Boussadia O., Steppe K., Zgallai H., Ben el Hadj S., Braham M., Lemeur R. & Van Labeke M.C. 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Scientia Horticulturae*. 123: 336-342.
- Chouliaras V., Tasioula M., Chatzissavvidis C., Therios I. & Tsabolatidou E. 2009. The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europea* L.) cultivar Koroneiki. *Journal of Sci. Food Agric*. 89: 984-988.
- Fernández-Escobar R., Marin L., Sánchez-Zamora M.A., García-Novelo J.M., Molina-Soria C. & Parra M.A. 2009. Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile. *European Journal of Agronomy*. 31: 223-232.

## Tablas y Figuras

**Figura 1-** Análisis de Componentes Principales de los distintos tratamientos.



**Figura 2-** Relación del peso y medidas pomológicas de los frutos según tratamiento.**Figura 3-** Análisis organoléptico de los aceites según tratamiento

**Tabla 1-** Mediciones de aceituna y hueso evaluadas.

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Peso fruto (g)	0.93 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.22 <sup>c</sup>	0.99 ± 0.29 <sup>d</sup>	1.03 ± 0.27 <sup>d</sup>	1.21 ± 0.23 <sup>b</sup>	1.38 ± 0.24 <sup>a</sup>
Largo fruto (mm)	12.41 ± 1.14 <sup>d</sup>	13.49 ± 1.12 <sup>b</sup>	12.66 ± 1.25 <sup>c</sup>	13.36 ± 1.16 <sup>b</sup>	13.46 ± 1.02 <sup>b</sup>	14.56 ± 1.11 <sup>a</sup>
Ancho A fruto (mm)	10.60 ± 0.93 <sup>d</sup>	11.51 ± 0.86 <sup>b</sup>	10.67 ± 1.09 <sup>d</sup>	11.13 ± 1.02 <sup>c</sup>	11.51 ± 0.93 <sup>b</sup>	12.80 ± 0.88 <sup>a</sup>
Ancho B fruto (mm)	10.20 ± 0.84 <sup>d</sup>	11.13 ± 0.83 <sup>b</sup>	10.19 ± 1.08 <sup>d</sup>	10.77 ± 1.02 <sup>c</sup>	11.09 ± 0.86 <sup>b</sup>	12.39 ± 0.87 <sup>a</sup>
Peso endocarpio (g)	0.27 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.07 <sup>cd</sup>	0.30 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>bc</sup>
Largo endocarpio (mm)	9.33 ± 0.81 <sup>d</sup>	10.05 ± 0.85 <sup>b</sup>	9.76 ± 0.94 <sup>c</sup>	9.92 ± 0.84 <sup>bc</sup>	10.36 ± 0.82 <sup>a</sup>	10.14 ± 0.80 <sup>ab</sup>
Ancho A endocarpio (mm)	6.63 ± 0.48 <sup>d</sup>	6.82 ± 0.48 <sup>b</sup>	6.75 ± 0.50 <sup>bc</sup>	6.70 ± 0.47 <sup>cd</sup>	7.03 ± 0.46 <sup>a</sup>	6.66 ± 0.35 <sup>cd</sup>
Ancho B endocarpio (mm)	6.45 ± 0.46 <sup>d</sup>	6.64 ± 0.43 <sup>b</sup>	6.57 ± 0.52 <sup>bc</sup>	6.50 ± 0.44 <sup>cd</sup>	6.82 ± 0.42 <sup>a</sup>	6.52 ± 0.36 <sup>cd</sup>
Relación pulpa/endocarpio	0.70 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.73 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>a</sup>

**Tabla 2-** Media de peso producción por árbol según tratamiento

Tratamiento	Peso (kg/árbol)
T0	5.60
T1	5.98
T2	6.32
T3	6.14
T4	6.25
T5	7.19

**Tabla 3-** Composición de los aceites obtenidos por tratamiento.

Trat.	Composición en ácidos grasos												
	Miristic	Palmitic	Palmitoleic	Margaric	Margaroleic	Estearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	Araquidic	Gadoleic	Behenic	Lignoceric
T0	<0,01	11,01	1,19	0,06	0,08	2,27	78,60	5,31	0,58	0,42	0,31	0,15	0,02
T1	<0,01	10,97	1,12	0,08	0,10	2,38	78,53	5,38	0,56	0,41	0,34	0,11	0,02
T2	<0,01	10,88	1,10	0,05	0,08	2,35	78,72	5,32	0,57	0,44	0,30	0,15	0,04
T3	<0,01	10,98	1,15	0,05	0,09	2,34	78,55	5,37	0,54	0,44	0,33	0,14	0,02
T4	<0,01	11,12	1,18	0,04	0,10	2,36	78,69	4,96	0,60	0,43	0,35	0,14	0,03
T5	<0,01	11,02	1,16	0,04	0,11	2,35	78,94	4,86	0,57	0,42	0,35	0,15	0,03

## **Desenvolvimento de uma ferramenta para estimativa da produção de azeitona em olival em sebe**

Filipe Soveral Santos<sup>1</sup>, António Cordeiro<sup>1</sup>, José Silvestre<sup>2</sup>, Rocio Arias-Calderón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I. P. (INIAV) Estrada de Gil Vaz Ap 6 7351-901 Elvas, Portugal. filipe.santos@iniav.pt, antonio.cordeiro@iniav.pt, rocio.arias@iniav.pt;

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I. P. (INIAV) Quinta da Almoinha, 2565-191 Dois Portos, Torres Vedras. jose.silvestre@iniav.pt

### **Resumo**

A olivicultura é uma atividade agrícola com elevada importância em Portugal representando cerca de 95.5 milhões de euros, em que 50 % da produção total está localizada no Alentejo, onde se destacam os novos olivais de alta densidade e em sebe. Nestes olivais e pela importância económica que supõe a produção, a estimativa de produção poderá ser uma ferramenta imprescindível na gestão dos olivais. Para o gestor agrícola, o facto de saber antecipadamente quanto espera produzir, permite ajudar a definir necessidades de investimento e a planificar de forma eficaz todas as tarefas, desde as atividades no campo até à comercialização.

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia que, a partir da análise de fotografias com recurso a equipamentos acessíveis, fosse capaz de suportar uma ferramenta de estimativa da produção do olival, aplicável a outros olivais.

As imagens foram processadas através do *software free* ImageJ e foi desenvolvida uma macro para automatizar o processo. Foram avaliados frutos em ramos de três variedades de oliveira estabelecidas em sebe: ‘Arbequina’, ‘Koroneiki’ e ‘Arbosana’. Foram discriminadas diferentes alturas da copa e diferentes estados fenológicos (71 – 89) segundo a escala BBCH (*Biologische bundesanstalt, bundessortenamt und chemische industrie*). A macro desenvolvida foi capaz de reconhecer até 75% das azeitonas fotografadas, nomeadamente em ‘Koroneiki’, ‘Arbosana’ e ‘Arbequina’, não sendo significativa a diferença entre as variedades relativamente à altura da copa considerada. A macro desenvolvida deverá ser aplicada a um maior número de fotografias de forma a enriquecer a equação de previsão para cada variedade tentar obter uma maior representatividade nos estados fenológicos iniciais. Trata-se de um processo fácil, rápido, expedito, capaz de ser implementado em sistemas autónomos mais complexos e adaptado às principais variedades de oliveira estabelecidas em sebe em Portugal para valorizar a ferramenta.

**Palavras-chave:** ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, ‘Koroneiki’, *Olea europaea* L., tratamento de imagem.

### **Abstract**

Olive growing systems are of enormous relevance from the economic and ecological perspective in Portugal, achieving 95,5 million euros. About 50% of Portugal production is located at “Alentejo” region, where most of the super higher density (SHD) orchards are located. In SHD orchards, with high economic impact, production estimation can be a powerful tool in olive orchards management. To the manager, the ability to predict yields will allow to schedule a most efficient investments and planning throughout the value chain.

The main objective of this work was to develop a preliminary procedure based on image analysis from olive branches of different olive variedades using basic informatic tools; this could be implemented as a production prediction tool. The images were processed throw ImageJ, a free software, with the development of a *macro* that would be able to replicate the same procedures to all the selected images. We evaluated fruitful olive branches of tree olives variedades used in SHD: ‘Arbequina’, ‘Koroneiki’ e ‘Arbosana’. Images were taking from three heights of the tree canopy and different phenological states according with BBCH scale (*Biologische bundesanstalt, bundessortenamt und chemische industrie*). The *macro* developed recognized up to 75% of the olives in branches without discrimination about the location of the branches in the canopy. The *macro* developed should be applied to a major number of images to improve the prediction equation for each olive variedade and in earlier phenological states. The procedure defined it’s easy to reply, fast, expeditious, can be implemented in complexed and automated systems and can also be applied to major olives variedades used in SHD orchards. The conclusions obtained from the analysis of the measurements and the proposed model can be easily extended (or applied directly) to other types of olive orchards.

**Keywords:** ‘Arbequina’, ‘Arbosana’, image processing, ‘Koroneiki’, *Olea europaea* L.,

### **Introdução**

A oliveira (*Olea europaea* L.) representa a cultura que prevalece na região mediterrânea. Atualmente, a cultura da oliveira estende-se por 11,5 milhões de hectares distribuídos por 58 países dos 5 continentes, sendo os produtos resultantes da atividade, azeite e azeitona de conserva, consumidos em 179 países. A olivicultura mundial emprega mais de 35 milhões de pessoas, representando 1.20% da população ativa, e um volume de negócios próximo de 14 biliões de euros (INE, 2018).

A tendência, nos últimos anos, passa pela modernização, melhoria na qualidade dos produtos, plantações de novos olivais intensivos e de alta densidade, com vista a um aumento de produtividade (poda de rejuvenescimento, irrigação, mecanização), bem como um aumento no rendimento e produção (Vilar & Pereira, 2018).

Em termos económicos, a olivicultura em Portugal representa cerca de 95.5 milhões de euros, estando 50 % da produção nacional de azeitona localizada no Alentejo (GPP, 2018).

A estimativa de produção pode ser uma ferramenta imprescindível na gestão agrícola porque permite ao gestor/agricultor, saber antecipadamente quanto pode esperar obter com a sua produção, em que condições, quantidade, qualidade e índice de maturação, ajudando-o a definir necessidades de investimento e planificar tarefas, desde as atividades no campo até à sua comercialização.

Atualmente, o processo de estimativa de produção baseia-se no conhecimento dos gestores e técnicos agrícolas e na integração de vários parâmetros agronómicos, em diferentes períodos fenológicos críticos para a cultura da oliveira, como condições edafoclimáticas do local, histórico de produção, condições de desenvolvimento da cultura, práticas culturais praticadas e estado fitossanitário. Recentemente, estão a ser desenvolvidas abordagens e serviços que visam integrar a metodologia de estimativa com uma componente tecnológica no sentido de a uma maior precisão e identificação da exploração agrícola, com base em imagens de satélite (Gómez *et al.*, 2011; Serbina e Miller, 2014;) ou imagens aéreas (Jiménez-Brenes *et al.*, 2018; Zarco-Tejada *et al.*, 2014).

Contudo, estas abordagens ainda não são economicamente acessíveis para grande parte do sector.

À semelhança de trabalhos desenvolvidos para culturas herbáceas, em pimentos (Bachche e Oka, 2013) ou em morangos (Puttemans *et al.*, 2016), e em culturas lenhosas, como citrinos (Li *et al.*, 2011; Kurtulmus *et al.*, 2011), macieira (Keresztes *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015; Puttemans *et al.*, 2016), manga (Payne *et al.*, 2013), mirtilos (Li *et al.*, 2014; Font *et al.*, 2015) ou vinha (Tyrin e Barkai, 2009), em oliveira desenvolveu-se uma abordagem que faz uso de equipamentos economicamente acessíveis como máquina fotográfica e computador, que num futuro poderá permitir o desenvolvimento duma aplicação para *smartphone* com o objetivo de estimar a produção do olival a partir da análise de fotografias de ramos de oliveira.

## Materiais e métodos

Na Herdade Maria da Guarda (Serpa, região do Baixo Alentejo) foram avaliadas três das variedades mais comuns nos olivais em sebe em Portugal ‘Arbequina’, ‘Koroneiki’ e ‘Arbosana’ (Quadro 1). Foram considerados três blocos aleatoriamente distribuídos, com três árvores cada. A altura média das copas das árvores (2.3, 2.7 e 3.8 m em ‘Arbosana’, ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’, respetivamente) foi dividida em três partes iguais: baixa, média e alta; limitada na parte superior pela zona produtiva (ramos de 2 anos) e monitorizados os dois lados da sebe (E-O) com o objetivo de avaliar o comportamento produtivo segundo a exposição.

Foram fotografados ramos de oliveiras com frutos, com uma máquina fotográfica compacta (Sony Cyber-shot DSC-W120), em diferentes estados fenológicos (71 a 89) segundo a escala *Biologische bundesanstalt, bundessortenamt und chemische industrie* (BBCH). As fotografias foram tiradas a 60 cm de distância perpendicularmente ao comprimento do ramo. Foi utilizada uma cartolina preta para reduzir o erro que poda vir a gerar o fundo das imagens.

As imagens foram trabalhadas digitalmente através do ImageJ v0.51, que é um *software* de processamento de imagem gratuito, fácil de utilizar, escrito em Java, capaz de analisar fotografias e converter os resultados em números, de automatizar tarefas rotineiras e de desenvolver ferramentas. A cor das fotografias foi corrigida através da introdução do código na *macro*, desenvolvido por Vytas Bindokas; Oct 2006, Univ. of Chicago e modificado por Patrice Mascacchi, 2014, Univ. of Cambridge UK (WEB GitHub).

Para corrigir a variação da dimensão da azeitona ao longo dos estados fenológicos, para cada variedade, assim como a variação da distância focal, foi necessário implementar uma operação manual para definir o comprimento médio das azeitonas fotografadas.

As fotografias foram decompostas segundo o sistema de cores RGB, em cada uma das suas componentes, vermelho (R), verde (G) e azul (B) e, à semelhança das abordagens revistas por Hamuda *et al.* (2016), desenvolveu-se uma equação diferente à anteriormente referida,  $(G - ((B - R) + (B - G) + (G - R)))$ , que melhor diferencia as azeitonas dos restantes elementos.

As imagens resultantes foram invertidas, melhoradas (contraste e *Threshold*) e o tamanho foi reduzido para diminuir a definição da imagem assim como o tempo de processamento. Depois foram convertidas num formato binário e utilizada a função *Watershed* para proceder à análise das partículas.

O processo foi introduzido numa *macro* e aplicado a todas as imagens de forma a automatizar o tratamento digital das imagens.



## Resultados e discussão

Foram reportadas diferenças intervarietais e intravarietais a nível da cor das azeitonas de acordo com a evolução do processo de maturação, passando de tons de verde, para tons de amarelo, vermelho e preto. Pretendia-se iniciar o processo de estimativa de produção no estado fenológico BBCH 71, quando as azeitonas apresentam 10% do seu tamanho final e são de cor verde intensa (semelhante à cor verde das folhas). Apesar de terem forma substancialmente diferente, quando observadas em determinadas perspetivas, as folhas podem assemelhar-se a frutos (Quadro 1). Nos outros estados da escala fenológica, as diferenças tornaram-se mais evidentes.

Através da análise de 239 fotografias (Quadro 1), 52 de ‘Koroneiki’, 54 de ‘Arbequina’ e 76 de ‘Arbosana’, foi possível reconhecer até 73% das azeitonas fotografadas na ‘Arbequina’. Não foi possível observar correlações significativas entre o número de azeitonas e a área da copa onde foram tiradas as fotografias. O seja, poderia parecer que as azeitonas na altura do observador poderiam ser identificadas com maior eficiência, mas não foi isso o constatado.

Quando avaliado do ponto de vista varietal, a abordagem funcionou melhor em ‘Arbequina’, na qual foi capaz de identificar 89% das azeitonas face à ‘Arbosana’, com 56% e à ‘Koroneiki’, apenas com 51% de reconhecimento. Segundo a escala BBCH (estados 71, 80 e 85) a ferramenta desenvolvida reconheceu o 73%, 74% e 66% da produção total de cada ramo, respetivamente (Quadro 2).

Com base nestes resultados, poderá ser muito interessante fazer uma macro diferente para cada variedade de oliveira em vez da abordagem generalista, à semelhança do que é feito em vinha (Grossetete *et al.*, 2012)

## Conclusão

A estimativa de produção em oliveira com base na análise de imagens ainda não foi otimizada devido às semelhanças entre azeitonas e folhas de oliveira, quer a nível da cor, quer da forma e da evolução da maturação ao longo do tempo. O processo desenvolvido é rápido, expedito, com instruções diretas (protocolo simples), com uma alta reprodutibilidade com vistas à utilização de vários observadores. De outro lado, supõe uma maior limitação para o desenvolvimento duma metodologia com vistas a homogeneizar a qualidade de recolha das fotografias e informação em campo. Os diferentes estados fenológicos nos que foi realizado este trabalho (71 a 89), demonstraram a aplicabilidade desta ferramenta desenvolvida nos diferentes estados considerados, podendo ainda ser implementado em sistemas autónomos mais complexos (fig. 1). A abordagem foi inovadora, uma vez que através de recursos economicamente acessíveis foi possível identificar até 74% das azeitonas fotografadas em duas das principais variedades de oliveira em sebe utilizadas atualmente (‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’).

Será necessário otimizar a metodologia apresentada de forma a incluir os estados fenológicos “chave”, ou seja, os que permitam descrever um padrão de comportamento de cada variedade de forma a otimizar um padrão de comportamento entre cada variedade e cada estado fenológico; de forma a poder ser uma metodologia extensível a diferentes áreas deste novo sistema de olival; nos que prevalecem áreas monovarietais.

Alem disso, uma metodologia que otimize a discriminação dos diferentes estados fenológicos chave no desenvolvimento da produção das azeitonas, irá a ser uma ferramenta essencial para a estimativa da produção de azeitona e irá a permitir a transferência desta metodologia ao setor. Melhorar a percentagem de reconhecimento dos frutos em estados fenológicos antecipados, pode potenciar uma mais fiável e precoce

toma de decisão na operacionalização das atividades agronómicas, quando integrada numa ferramenta de apoio à decisão.

Esta técnica permite, assim, fazer previsões de rendimento confiáveis, que ajudem os olivicultores a ajustar a produção do seu olival com uma maior eficiência.

### **Agradecimentos**

Financiado pelo Projeto de I&DT Empresas em Co-promoção com a Referência POCI-01-0247-FEDER-018029 SmartFarming - Ferramenta avançada para operacionalização da agricultura de precisão onde o Filipe Soveral Santos é bolseiro.

### **Referências**

- Bachche, S. Oka, K., 2013. Distinction of Green Sweet Peppers by Using Various Color Space Models and Computation of 3 Dimensional Location Coordinates of Recognized Green Sweet Peppers Based on Parallel Stereovision System. *Journal of System Design and Dynamic* 7 (2) p. 178-196
- Font, D., Tresanchez, M., Martínez, D., Moreno, J., Clotet, E., & Palacín, J., 2015. Vineyard yield estimation based on the analysis of high resolution images obtained with artificial illumination at night. *Sensors*, 15(4), 8284-8301.
- Gatica, G., Best, S., Ceroni, J., & Lefranc, G., 2013. Olive fruits recognition using neural networks. *Procedia Computer Science*, 17, 412-419.
- Gómez, J. A., Zarco-Tejada, P. J., García-Morillo, J., Gama, J., & Soriano, M. A. (2011). Determining biophysical parameters for olive trees using CASI-airborne and Quickbird-satellite imagery. *Agronomy journal*, 103(3), 644-654.
- GPP. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. Sistema De Informação Do Azeite E Azeitona De Mesa, 2018.
- Grossetete, M., Berthoumieu, Y., Da Costa, J. P., Germain, C., Lavialle, O., & Grenier, G., 2012. Early estimation of vineyard yield: Site specific counting of berries by using a smartphone. In *International Conference of Agricultural Engineering—CIGR-AgEng*.
- Hamuda, E. Glavin, M. and Jones, E., 2016. A survey of image processing techniques for plant extraction and segmentation in the field. *Computers and Electronics in Agriculture* 125, Páginas 184-199
- Jiménez-Brenes, F. M. López-Granados, F. de Castro, A. I. Torres-Sánchez, J. Serrano, N. & Peña, J. M., 2017. Quantifying pruning impacts on olive tree architecture and annual canopy growth by using UAV-based 3D modelling. *Plant Methods* 13:55
- Keresztes, B., Lavialle, O., Grenier, G., & Vaysse, P., 2012. Apple yield estimation during the growth season using image analysis. *Proc. Automation Technol. Off-Road Equipment*, 221-226.
- Kim, D., Choi, H., Choi, J., Yoo, S. J., & Han, D., 2015. A novel red apple detection algorithm based on AdaBoost learning. *IEIE Transactions on Smart Processing & Computing*, 4(4), 265-271.
- Kurtulmus, F., Lee, W. S., & Vardar, A., 2011. An advanced green citrus detection algorithm using color images and neural networks. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 7(2).
- Li, H., Lee, W. S., & Wang, K., 2014. Identifying blueberry fruit of different growth stages using natural outdoor color images. *Computers and electronics in agriculture*, 106, 91-101.

- Li, P., Lee, S. H., & Hsu, H. Y., 2011. Study on citrus fruit image data separability by segmentation methods. *Procedia Engineering*, 23, 408-416.
- Payne, A. B., Walsh, K. B., Subedi, P. P., & Jarvis, D., 2013. Estimation of mango crop yield using image analysis–segmentation method. *Computers and electronics in agriculture*, 91, 57-64.
- Puttemans, S. Vanbrabant, Y. Tits, L. Goedem, T., 2016. Automated visual fruit detection for harvest estimation and robotic harvesting, Sixth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications
- Serbina, L.O. & Miller H.M., 2014. **Landsat and water: Case studies of the uses and benefits of Landsat imagery in water resources**. U.S. Geological Survey Open-File Report 2014 – 1108
- Tyrin, S., & Barkai, I., 2009. Automatic Grape Clusters Detection in Vineyard Images. *Final Project of Computer Science, Ben Gurion University of the Negev*.
- Vilar, J. & Pereira, J. 2018La Olivicultura internacional. ISBN: 978-84-946394-8-7
- Web FARMD - Forum for Agricultural Risk Management in Development <https://www.agriskmanagementforum.org/content/basic-concepts>, consultado em 2018
- WEB GitHub – GitHub. [https://github.com/pascalchi/ImageJ\\_Auto-white-balance-correction/blob/master/White%20balance%20correction\\_1.0.ijm](https://github.com/pascalchi/ImageJ_Auto-white-balance-correction/blob/master/White%20balance%20correction_1.0.ijm), consultado em 2017
- Zarco-Tejada, P. J., Diaz-Varela, R., Angileri, V., & Loudjani, P., 2014. Tree height quantification using very high resolution imagery acquired from an unmanned aerial vehicle (UAV) and automatic 3D photo-reconstruction methods. *European journal of agronomy*, 55, 89-99.

**Quadros e Figuras****Quadro 1** - Exemplos de fotografias de ramos de oliveira, antes e depois de processadas

Variedade e  
estado  
fenológico  
(BBCH)

Fotografia

Após processamento

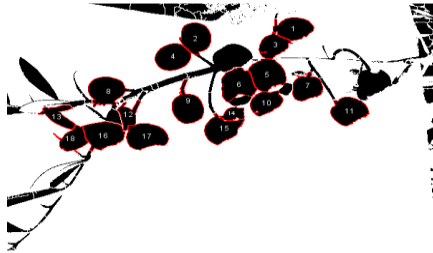
'Arbequina'  
Estado 80



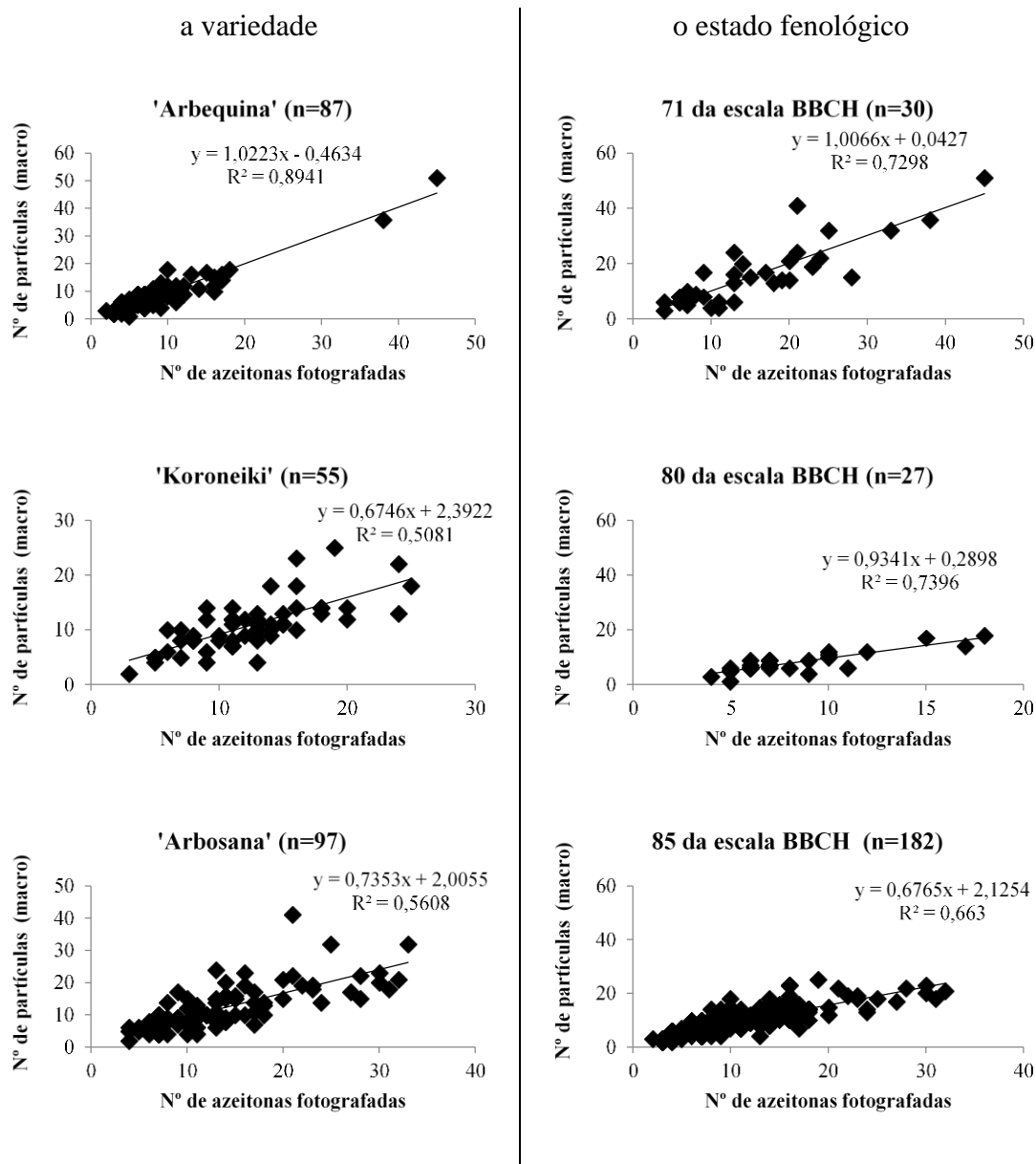
'Koroneiki'  
Estado 85



'Arbequina'  
Estado 85

**Quadro 2** – Caracterização da amostragem quanto à variedade, altura do ano, estado fenológico assim como número de azeitonas por ramo

Variedade	Estado fenológico (BBCH)	Nº de fotografias		Contagem	
		Total		manual Média ± sd	ImageJ (macro) Média ± sd
'Arbequina'	71	6	87	19,3 ± 17,6	20 ± 19,3
	80	27		8,3 ± 3,6	8,1 ± 4,0
	85	54		7,2 ± 3,7	6,9 ± 3,8
'Arbosana'	71	21	97	14,2 ± 7,7	14,8 ± 10,4
	80	76		13,2 ± 6,8	11,0 ± 5,2
'Koroneiki'	71	3	55	19,0 ± 5,6	16,3 ± 4,9
	85	52		12,1 ± 4,7	10,5 ± 4,5



**Figura 1** - Relação entre o número de azeitonas contadas pelo programa e contadas manualmente segundo variedade ou estado fenológico

## Momento ótimo de maturação para a colheita de cinco variedades de oliveira da região do Alentejo

Elsa Lopes<sup>1,4</sup>, Graça Pacheco de Carvalho<sup>1</sup>, Francisco Mondragão-Rodrigues<sup>1,2</sup>, Luís Alcino Conceição<sup>1,2</sup>, Augusto Peixe<sup>2</sup>, Mónica Madrigal Martínez<sup>3</sup>, Manuel A. Martínez-Cañas<sup>3</sup> & Jacinto Sánchez Casas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Portalegre, Escola Superior Agrária de Elvas, Portugal

<sup>2</sup>ICAAM, Universidade de Évora, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura, Espanha

<sup>4</sup>Universidad de Extremadura, Badajoz, Espanha, Email: elsalopes@ipportalegre.pt

### Resumo

Para obtenção de azeites de alta qualidade, as azeitonas devem ser colhidas no momento ótimo de maturação. Um dos fatores que contribuem para a definição deste momento é a estabilização do teor de gordura na matéria seca (GMS). Sabendo que a determinação da GMS só pode ser feita recorrendo a análises laboratoriais ou autoanalisadores, é conveniente, encontrar uma metodologia mais expedita para ajudar a definir o momento ótimo da colheita, como por exemplo o Índice de Maturação (IM).

Na campanha de 2017/2018, foi realizado um estudo que relacionou a evolução da GMS com a evolução da cor dos frutos medida através do IM. Em 5 olivais do Alentejo, foram colhidas amostras de azeitona (em 20 oliveiras/olival) das variedades “Azeiteira”, “Cobrançosa”, “Cordovil de Serpa”, “Galega vulgar” e “Blanqueta”, entre meados de setembro e finais de dezembro de 2017, nas quais se determinou o IM, pelo método de Jaén, e a GMS através de um equipamento Olivia™ da marca FOSS.

Os resultados obtidos nesta campanha permitem verificar que existe uma elevada correlação entre GMS e o IM ( $R^2$  varia entre 0,63 e 0,98), aumentando o teor de gordura nos frutos com a evolução da coloração das azeitonas, até estabilizar nos 34% - 46% consoante a variedade, quando o IM apresenta valores entre 2,7 e 3,9 para a maioria das variedades. Na variedade “Cobrançosa”, a estabilização do teor de GMS ocorreu mais cedo, quando o IM alcançou valores entre 2,0 e 2,2 enquanto a variedade ‘Galega’ foi a última a estabilizar (IM 3,9).

Para a campanha de 2017/2018, as datas correspondentes ao momento ótimo de colheita foram 2 de novembro para a “Cobrançosa” (IM 2,0-2,2), “Blanqueta” (IM 2,8) e “Galega” (IM 3,9); 20 de novembro para a “Cordovil de Serpa” (IM 2,7-3,8) e 27 de novembro para a “Azeiteira” (IM 3,9).

Portanto, verifica-se que a data em que a gordura no fruto estabiliza, servindo de indicador para o momento ótimo de colheita, corresponde a IM diferentes consoante a variedade. Estes resultados, ao serem preliminares, terão de ser confirmados nas próximas campanhas olivícolas.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L., Azeite, Índice de Maturação, Gordura na matéria seca, Olival.

### Abstract

In order to obtain high quality olive oils, the olives should be harvested at the optimum time of maturation. One of the factors contributing to the definition of this moment is the stabilization oil content on dry weight basis (OPDW). This determination

can only be performed by laboratory analysis. An alternative approach to find the optimum time harvesting is using a more practical methodology, such as the fruit ripening index (RI).

In 2017/2018 campaign, a study was carried out to understand the relationship between OPDW and turn colour of ripen fruits according to RI. Samples were collected from five olive orchards in the Alentejo region (20 trees per orchard) from 'Azeiteira', 'Cobrançosa', 'Cordovil de Serpa', 'Galega vulgar' and 'Blanqueta' varieties between mid-September and the end of December. RI was determined by the Jaen method and OPDW using a FOSS Olivia<sup>TM</sup> NIR analyser. The results obtained allow us to verify that there is a high correlation between OPDW and RI ( $R^2$  varies between 0,63 and 0,98), increasing the OPDW in the fruits with the evolution of the olives colour, until stabilizing in 34% - 46%, depending on the variety, when the RI presents values between 2,7 and 3,9 for most varieties. To 'Cobrançosa' variety, the stabilization of OPDW was earlier with a RI between 2,0 and 2,2, while the 'Galega' variety was the last to stabilize (RI 3,9). The dates for the optimum harvest were 2nd November for "Cobrançosa" (IM 2,0-2,2), "Blanqueta" (IM 2,8) and "Galega" (IM 3,9); 20th November for "Cordovil de Serpa" (IM 2,7-3,8) and 27th November for 'Azeiteira' with a RI of 3,9.

Therefore, it is verified that the date in which the fat in the fruit stabilizes, serving as indicator for the optimal harvesting moment, corresponds to different IM according to the variety. These results, being preliminary, will have to be confirmed in the next olive growing season. Consequently, it is verified that RI can be used to determine the optimal harvesting time, because it is highly related to the OPDW evolution. OPDW stabilization corresponds to a different RI depending on the variety. These preliminary findings deserve further attention and research evaluation in next campaigns.

**Keywords:** *Olea Europaea* L., Olive oil, Ripening Index; Oil content on dry weight basis, Olive groves.

## Introdução

A determinação da data de colheita com base na avaliação da evolução da maturação da azeitona é fundamental para a obtenção de azeites de qualidade e deve realizar-se no momento ótimo de maturação, quando os frutos apresentam a máxima quantidade de gordura com as melhores características (Beltrán *et al.*, 2004, Cordeiro *et al.* 2016).

O processo de maturação pode ser observado visualmente nas variedades de azeitonas à medida que mudam gradualmente de cor, de verde-escuro a violeta e preto. A cor e a textura do endocarpo também mudam durante esses estados, assim como a cor e as características sensoriais do azeite obtido (COI, 2011). O conteúdo em azeite nas azeitonas é variável e depende da variedade, das condições climáticas, das condições culturais, do estado sanitário, dos recursos hídricos disponíveis e do momento da colheita (Di Giovacchino, 1998).

O acompanhamento das alterações da cor ao longo do processo de maturação dos frutos tem sido descrito por diversos autores (Beltrán *et al.*, 2004; Garcia & Yousfi, 2005; COI, 2011; Peres *et al.*, 2012), constituindo-se como um bom indicador complementar para a determinação da data de colheita pelo produtor. São apresentados na bibliografia valores do índice de maturação próximos de 3,5 para a variedade 'Picual' na região de Jaén como uma boa indicação para o olivicultor iniciar a colheita, sem perda do rendimento em azeite (Hermoso *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2008).

Com efeito, a seleção inadequada da época de colheita da azeitona pode comprometer a quantidade e a qualidade comercial de muitos azeites virgens (Di Giovachino, 1998; Peres *et al.* 2012 cit. García *et al.*, 1996).

A determinação do teor de gordura na matéria seca (GMS) continua a ser uma indicação fundamental na decisão do momento ótimo de colheita, além de outros critérios, nomeadamente a resistência ao desprendimento, a firmeza da polpa face à colheita mecânica, o ataque pragas e doenças e a ocorrência de geadas (Peres *et al.*, 2012; Cordeiro & Mouro, 2014). Esta determinação pode ser feita recorrendo a análises laboratoriais ou autoanalisadores.

Inserido no projeto “OLEAVALOR – valorização das variedades de oliveira portuguesas” que pretende fazer a caracterização de algumas das principais variedades de oliveira cultivadas no Alentejo em sistema de condução intensivo e regime de regadio, realizou-se este trabalho com vista a contribuir para a determinação de um método simples e de fácil utilização pelo olivicultor na definição da data de colheita. Sabendo que a determinação da GMS só pode ser feita recorrendo a análises laboratoriais ou autoanalisadores, é conveniente encontrar uma metodologia mais expedita para ajudar a definir o momento ótimo da colheita, como por exemplo o Índice de Maturação (IM).

### Material e Métodos

Em 5 olivais da região do Alentejo, foram colhidas quinzenalmente amostras de azeitona das variedades “Azeiteira”, ‘Cobrançosa’, ‘Cordovil de Serpa’, ‘Galega vulgar’ e ‘Blanqueta’, entre meados de setembro e finais de dezembro de 2017. Por variedade, marcaram-se 5 blocos com 4 árvores, num total de 20 árvores. Foram colhidos, aproximadamente 100 frutos por bloco, aleatoriamente à altura do operador, nos quatro quadrantes de cada uma das árvores.

Em laboratório, depois de homogeneizadas, separaram-se aleatoriamente 100 frutos saudáveis de cada variedade e classificaram-se de acordo com as classes dos índices de maturação: Índice de Maturação de Jaén (IM) que varia de 0 a 7 baseado na coloração da epiderme e do mesocarpo do fruto segundo a metodologia e fórmula ( $IM = Ax0 + Bx1 + Cx2 + Dx3 + Ex4 + Fx5 + Gx6 + Hx7 / 100$ ) aplicada pelo IFAPA de Mengíbar, Jaén (COI, 2011).

O teor de gordura na matéria seca (GMS) foi determinado para cada variedade na pasta de azeitona por um equipamento autoanalisador Olivia<sup>TM</sup> da marca FOSS.

### Resultados e discussão

Os resultados obtidos nesta campanha permitem verificar valores de coeficiente de determinação entre o teor de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) a variar entre 0,63 e 0,98, aumentando o teor de gordura nos frutos com a evolução da coloração das azeitonas, até estabilizar nos 34% - 46% consoante a variedade, quando o IM apresenta valores entre 2,7 e 3,9 para a maioria das variedades. Na variedade “Cobrançosa”, a estabilização do teor de GMS ocorreu mais cedo, quando o IM alcançou valores entre 2,0 e 2,2 (figura 1 e figura 2) enquanto a ‘Galega Vulgar’ foi a última a estabilizar a GMS (IM 3,9) (figura 4). Peres *et al.* (2012) e Cordeiro & Mouro (2014) obtiveram resultados semelhantes nas variedades ‘Cobrançosa’ com valores de IM muito próximos de 3 e para a ‘Galega Vulgar’ IM entre 3,5 e 4.

Para a campanha de 2017/2018, as datas correspondentes ao momento ótimo de colheita foram 2 de novembro para a “Cobrançosa” (IM 2,0-2,2) (Figura 1 e 2); “Blanqueta” (IM 2,8) (Figura 3) e “Galega” (IM 3,9) (Figura 4); 20 de novembro para a “Cordovil de Serpa” (IM 2,7-3,8) (Figura 5 e 6) e 27 de novembro para a “Azeiteira” (IM 3,9) (Figura



7). Cordeiro & Mouro (2014) obtiveram resultados semelhantes, considerando as variedades ‘Blanqueta’ e ‘Galega Vulgar’ com uma maturação temporã e “Cordovil de Serpa” como uma variedade com maturação intermédia.

Estes resultados indicam que o acompanhamento do IM da azeitona para cada variedade, sabendo qual a classe do IM onde ocorre a estabilização da GMS, poderá ser um critério simples para o olivicultor decidir o momento de colheita das suas variedades.

### **Conclusões**

A data de colheita é um parâmetro dinâmico de cada olival, condicionado por diversos fatores. Neste estudo, para a avaliação do teor de gordura na matéria seca e o índice de maturação, verificou-se, que o indicador para o momento ótimo de colheita foi a data em que a gordura na matéria seca no fruto estabilizou, correspondendo a IM diferentes consoante a variedade. O acompanhamento do índice de maturação (IM) da azeitona poderá ser uma metodologia expedita para o olivicultor decidir o momento de colheita mais apropriado, minimizando as perdas de produção e a deterioração da qualidade do azeite.

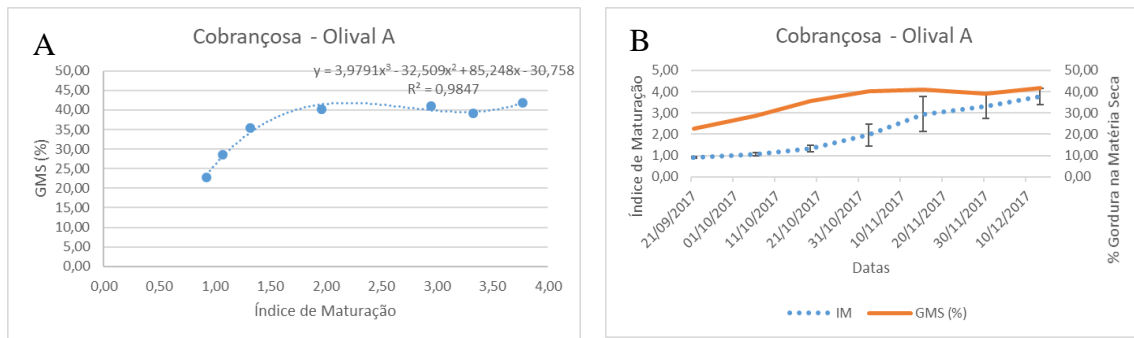
Estes resultados, ao serem preliminares, terão de ser confirmados nas próximas campanhas olivícolas.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pelo FEDER e por Fundos Nacionais, através do Programa Operacional Regional ALENTEJO 2020, Operação ALT20-03-0145-FEDER-000014 – “Valorização das Variedades de Oliveira Portuguesas (Oleavalor)”.

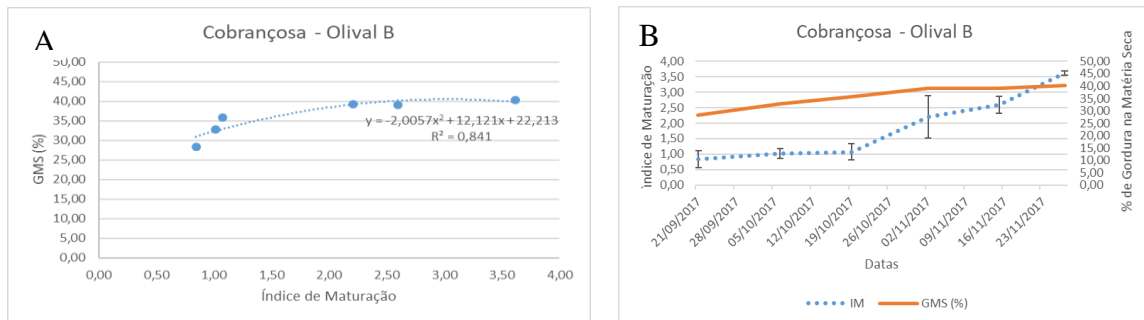
### **Referências bibliográficas**

- Beltrán, G., del Río, C., Sánchez, S. & Martínez L. 2004. Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *J. Sci. Food Agric.* 84:1783-1790.
- COI, 2011. Guide for the determination of the characteristics of oil-olives. INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL COI/OH/Doc. No 1 November 2011.
- Cordeiro, A. & Mouro, F. 2014. Colheita da Azeitona. p.245-255. In: Boas praticas no olival e no lagar, Jordão P. (Coord. Científico INIAV I.P), 1ª Edição SIG, Lisboa.
- Cordeiro, A., Inês, C., Quintans, F., Mouro, F. 2016. A fenologia da maturação e a oportunidade de colheita da azeitona. *Revista Oleavitis*, tiragem 2ºTrimestre 2016.
- Di Giovacchino, 1998. Recolección de las aceitunas y extracción del aceite de oliva. *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*, 1ª edición (25-30). Ed. Mundi-Prensa
- Garcia, J.M. e Yousfi M., 2005. Non-destructive and objective methods for the evaluation of the maturation level of olive fruit. *European Food Research & Technology*; Aug2005, Vol. 221 Issue 3/4, p538-541.
- Hermoso, M., Uceda, M., Frias, L. & Beltran, G. 1997. Maduración. p. 137-153. In: *El Cultivo del Olivo*. Ed. D. Barranco, D. Fernandez- Escobar & L. Rallo. Ediciones Mundi-prensa. Madrid.
- Ramos, A., Peres, M.F., Simões-Lopes, P. & Pinheiro-Alves, M.C. 2008. Olive ripening and harvest time in Portuguese cultivars of “Beira Interior” region. *Acta Hort.* 791: 693-696.

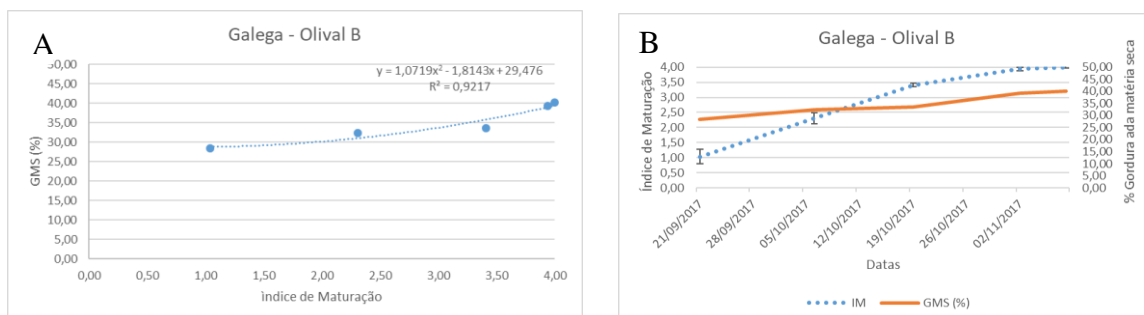
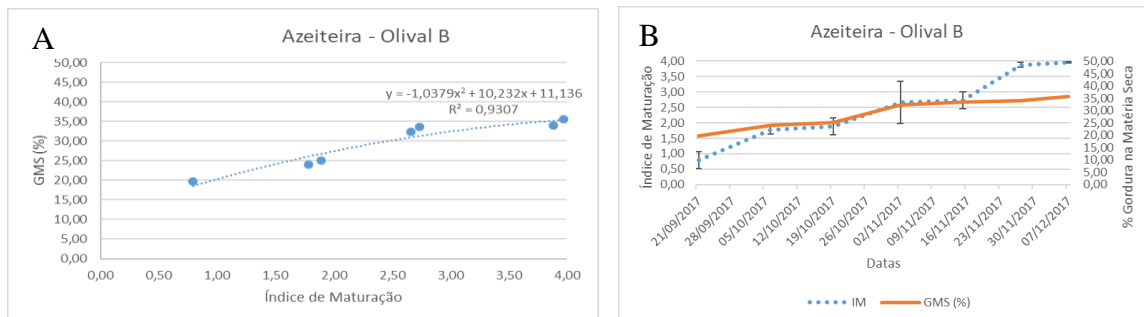
## Tabelas e Figuras



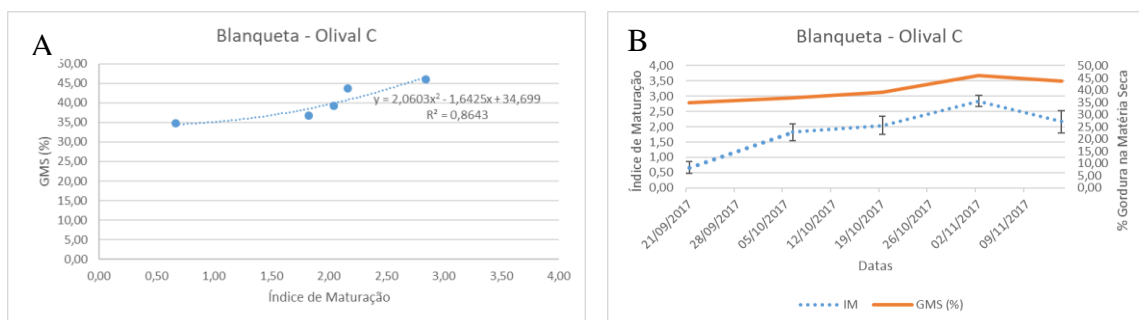
**Figura 1.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) na variedade 'Cobrançosa' num olival em Elvas.



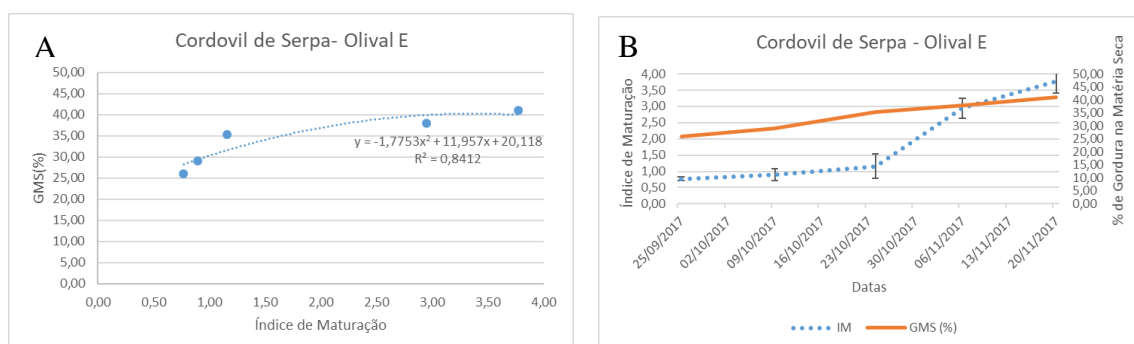
**Figura 2.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) maturação na variedade 'Cobrançosa' num olival em Monforte.



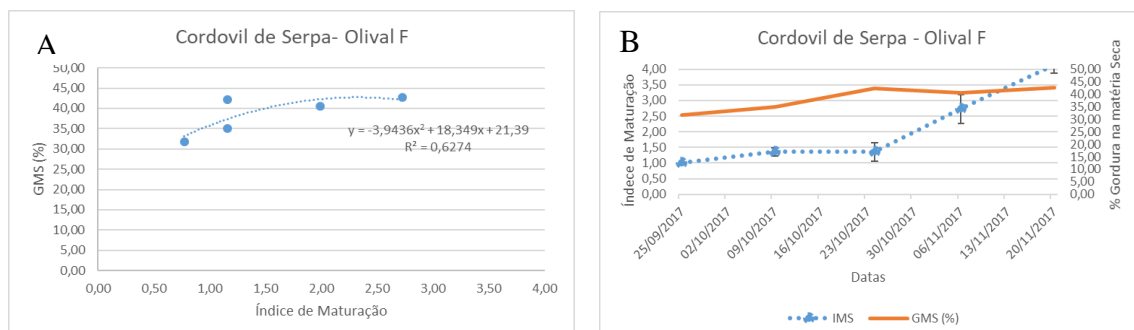
**Figura 4.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) na variedade 'Galega' num olival em Monforte.



**Figura 5.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) na variedade ‘Blanqueta’ num olival em Campo Maior.



**Figura 6.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) na variedade ‘Cordovil de Serpa’ num olival em Vale de Vargo (Serpa).



**Figura 7.** Relação entre percentagem de gordura na matéria seca (GMS) e o índice de maturação (IM) (A) e a evolução GMS com IM (B) na variedade ‘Cordovil de Serpa’ num olival em Vila Nova de São Bento (Serpa).

## **Sessão IV – Tecnologia, Qualidade**

## Azeites Virgens de Agricultura Biológica na Região de Idanha-a-Nova

Tânia Andrade<sup>1</sup>, Conceição Vitorino<sup>1</sup>, Cecília Gouveia<sup>1</sup>, Ofélia Anjos<sup>1,2,3</sup> & Fátima Peres<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Quinta Senhora de Mércules, Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, fperes@ipcb.pt

<sup>2</sup> Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, Castelo Branco, Portugal

<sup>4</sup> LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

### Resumo

O presente trabalho apresenta uma caracterização da qualidade de azeites produzidos em modo de produção biológica no Concelho de Idanha-a-Nova durante a campanha 20017/18. Foram analisadas 26 amostras de azeites provenientes predominantemente das cultivares ‘Galega Vulgar’, ‘Carrasquenha’, ‘Bical’ e ‘Cordovil de Castelo Branco’. Estudaram-se três sistemas de extração de duas fases: lagar móvel da Hiller, uma linha Oliomio, um lagar laboratorial; ao longo da campanha foram recolhidas amostras aí extraídas. Para a caracterização das amostras foram utilizados modelos de calibração, para avaliação de parâmetros analíticos, com recurso a metodologias no infravermelho próximo (NIR). A acidez dos azeites analisados apresentou valores inferiores a 0,8 %. Na composição em ácidos gordos, os azeites Galega e Carrasquenha são os mais pobres em polinsaturados. Os azeites Carrasquenha foram os que apresentaram teores de fenóis totais mais elevados.

**Palavras-chave:** ácidos gordos, azeitona, critérios qualidade, fenóis, NIR.

### Abstract

This work aims to present a quality characterization of organic virgin olive oils produced in Idanha-a-Nova Region during the harvest 2017/2108. Twenty-six samples of virgin olive oils produced from the main cultivars ‘Galega Vulgar’, ‘Carrasquenha’, ‘Bical’ and ‘Cordovil de Castelo Branco’ were evaluated. The samples were obtained by three different two phase extraction systems: Hiller mobile, Oliomio and Abencor. The characterization was performed by near infrared spectroscopy (NIR). Free fatty acids of all olive oils were lower than 0.8%. Galega and Carrasquenha olive oils had the lowest contents in polyunsaturated fatty acids. Carrasquenha olive oils had the highest contents in total phenols.

**Keywords:** fatty acids, olives, quality criteria, phenols, NIR.

### Introdução

O respeito pelo ambiente e a importância das questões relacionadas com a segurança alimentar explicam o interesse crescente do consumidor por alimentos produzidos em sistemas de agricultura sustentáveis, nomeadamente em modo de produção biológico.

A olivicultura em modo de produção biológico (MPB) afigura-se como um modelo de grande interesse para a valorização do olival e dos seus produtos,

principalmente se inserida num desenvolvimento rural integrado, com conhecimento científico e com o auxílio de estratégias de marketing territorial. A adesão do Município de Idanha-a-Nova à Rede Internacional de Eco-Regiões torna fundamental investigar as particularidades dos produtos agroalimentares produzidos através do MPB. É absolutamente necessário conhecer as potencialidades do território, do tecido agrícola e empresarial e dos produtos produzidos, para que assim seja possível impulsionar estratégias com vista à sua valorização económica nos mercados interno e externo. Na Beira Interior o olival é uma cultura que representa aproximadamente 34 % da Superfície Agrícola Utilizável (SAU), sendo uma região olivícola caracterizada pelo domínio de oliveiras tradicionais; no caso específico do concelho de Idanha-a-Nova, predominam essencialmente as cultivares ‘Galega Vulgar’, ‘Carrasquenha’, ‘Bical de Castelo Branco’ e ‘Cordovil de Castelo Branco’ (INE, 2009; Almeida, 2011).

As condições edafoclimáticas da região determinam fatores como a evolução da maturação, por seu turno, a cultivar influencia as características físicas do fruto, todavia, ambas conferem particularidades químicas ao azeite produzido (Alves, 1989; Gouveia, 1995; Carelli, 2008; Vaz-Freire *et al.*, 2008; Mailer *et al.*, 2010).

No presente trabalho apresenta-se uma caracterização de azeites produzidos em MPB no concelho de Idanha-a-Nova.

### Material e métodos

Estudaram-se três sistemas de extração: linha móvel de duas fases da *Hiller* (PM-030-CA) (Alemanha), lagar de duas fases *Oliomio 100-150 MGQB* (Itália) e equipamento laboratorial *Abencor* (Comercial Abengoa, Sevilha). Ao longo da campanha foram recolhidas amostras de azeite nestes três sistemas.

Analisaram-se 26 amostras de azeite produzidas na campanha 2017/2018, no Concelho de Idanha-a-Nova, com certificação para o modo de produção biológico. As amostras foram identificadas como provenientes das cultivares ‘Galega Vulgar’, ‘Carrasquenha’, ‘Bical’, ‘Cordovil de Castelo Branco’ ou lotes (mistura de mais de uma cultivar).

Foram utilizados modelos de calibração para avaliação de parâmetros analíticos (acidez, índice de peróxido, absorvâncias no UV e ácidos gordos maioritários (ácido oleico, palmítico, linoleico e esteárico) com recurso a metodologias no infravermelho próximo (NIR) (MPA, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha) utilizando o pacote de calibração *B-olive oil*. A informação espectral foi recolhida em amostras de azeite, previamente preparadas e filtradas segundo a Norma Portuguesa NP-896/85, obtidos à temperatura de 50 °C, em modo de absorvância e no comprimento de onda de 12000 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e 32 scans. O tratamento dos dados foi efetuado pelos softwares OPUS®, versão: 7.5.18.

De forma a classificar o azeite em categorias comerciais foi realizado o exame organolético dos azeites pelo painel de provadores da Escola Superior Agrária de Castelo Branco. O procedimento seguido foi o que está descrito no Regulamento de Execução (UE) N.º 1348/2013. No caso das azeitonas processadas no equipamento Abencor, as únicas amostras em que havia garantia de não serem lotes (misturas) de cultivares, avaliou-se ainda o teor em fenóis totais, a estabilidade oxidativa, com o respetivo índice de maturação da azeitona (IM). O método usado na determinação do índice de maturação foi o proposto por López-Villalta (2003). A estabilidade oxidativa foi avaliada em equipamento Rancimat 679 da Metrohm, utilizando um fluxo de ar de 20 L/h, 4 ml de amostra de azeite, à temperatura do bloco de aquecimento de 120 °C. Na quantificação dos fenóis totais o método utilizado baseia-se na reação do reagente Folin-Ciocalteu com

os grupos fenólicos e respetiva leitura da absorvância por espectroscopia VIS a 765 nm. Para a preparação da amostra efetuou-se uma micro extração líquido-líquido (LLME) baseada em Pizarro *et al.* (2013).

### Resultados e discussão

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados dos critérios de qualidade dos azeites obtidos nos distintos sistemas de extração. Considerando os critérios químicos analisados, todos os azeites poderiam ser classificados como *azeite virgem extra*. Porém, o exame organolético detetou 10 amostras com defeitos sensoriais. Estes resultados mostram que a adoção de boas práticas por parte do produtor deve ser transversal a qualquer método de produção usado na gestão do olival (Costa *et al.*, 2002; Afidol, 2018). As notas de frutado dos azeites obtidos nos sistemas industriais foram mais baixas que os extraídos em equipamento Abencor, destacando-se a intensidade de frutado mais elevado no azeite Carrasquenha.

Na Tabela 2 são expostos os valores médios de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico dos azeites analisados, por sistema de extração. Verifica-se que os azeites extraídos nos três sistemas apresentam uma composição média em ácidos-gordos muito semelhante, o que pode expressar a utilização em todos, de azeitonas das cultivares predominantes no concelho de Idanha-a-Nova.

Os azeites obtidos em sistema laboratorial *Abencor* apresentam valores máximos de ácido oleico e mínimos em linoleico, correspondente aos azeites da cultivar ‘Galega Vulgar’ (Vaz- Freire *et al.*, 2008; Peres *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2016). A composição em ácido palmítico, ácido oleico e linoleico é influenciada pelo clima em que o olival está inserido, o que pode explicar ligeiras diferenças. Verifica-se que o teor de ácido palmítico aumenta em climas mais quentes e os teores de ácido oleico e linoleico variam inversamente ao anterior (Curci, 2001; Mailer *et al.* 2010).

Na Tabela 3 apresentam-se o teor em polinsaturados, em fenóis totais e a estabilidade oxidativa dos azeites monovarietais extraídos em equipamento Abencor. O azeite Carrasquenha é o que apresenta o teor mais elevado de fenóis totais, o que conjuntamente com o baixo teor de polinsaturados lhe confere uma elevada estabilidade oxidativa, próximo do azeite Galega de Idanha-a-Velha, obtido com azeitonas com um índice de maturação mais elevado. Os azeites Galega, apesar de não apresentarem elevados teores de fenóis, são em geral mais estáveis do que outros azeites monovarietais, nomeadamente, Bical ou Cordovil, mais ricos em compostos fenólicos (Henriques *et al.*, 2001). Como se pode observar na Tabela 3, o azeite Bical, o mais rico em polinsaturados, a estabilidade oxidativa é a mais baixa. Assim, a composição em ácidos gordos contribui mais para a estabilidade oxidativa do que a presença de fenóis. A análise em componentes principais dos espetros dos azeites estudados (Figura 1) mostra a aproximação dos azeites de acordo com as cultivares de origem.

### Conclusões

Os resultados obtidos por NIR permitiram caracterizar os azeites face aos seus critérios de qualidade e à sua composição em ácidos gordos maioritários. Nos critérios químicos todos os azeites estão conforme a categoria de virgem extra. É face ao exame organolético que se verifica que ainda há procedimentos a melhorar, para que não venham a surgir defeitos no azeite. Os azeites Carrasquenha apresentaram elevado teor em compostos fenólicos, a corresponder a notas mais acentuadas de frutado no exame organolético, o que pode potenciar a sua diferenciação e valorização nesta região.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado pelo projeto CENTRO-04-3928-FEDER-000009 - Beira Baixa Terras de Excelência - Comunicação, Animação e Inovação. O trabalho foi realizado no âmbito da unidade de investigação LEAF (UID/AGR/04129/2019).

### Referências

- Alves, M. 1989. Diagnóstico de Situações Determinantes da Alteração da Qualidade do Azeite em Lagares da Região do Alto Alentejo. INIA. ENTPA. NTAE.
- Afidol. 2018. Les Bonnes Pratiques d'Hygiène pour l'élaboration de l'Huile d'Ólive Vierge. Association Française Interprofessionnelle de l'Ólive.
- Carelli, A. 2008. *Olive Oil Chemistry in Argentina*. Plante Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur-CONICET).
- Costa, B.; Gouveia, J.; Dionísio, L.; Carolo, N. & Oliveira, S. 2002. Código de Boas Práticas para o Processamento Tecnológico dos Azeites Virgens. Casa do Azeite.
- Curci, V. 2001. Caratteristiche dell' oliva. In: Manuale dell'olio d'oliva. pp.31-43. Edagricole - Edizioni Agricole della Società Gruppo Calderini Edagricole.
- Gouveia, J. 1995. Azeites virgens do Alto Alentejo, comportamento químico, tecnológico e sensorial. UTL. Lisboa.
- Mailer, R., Ayton, J., & Graham, K. 2010. The Influence of Growing Region, Cultivar and Harvest Timing on the Diversity of Australian Olive Oil. *J Am Oil Chem Soc*, 87:887-884.
- Henriques, L.R., Peres, M. F., Vitorino, M.C., Pinheiro-Alves, M.C. & Simões, P. 2001. Estabilidade Relativamente à Oxidação de Azeites Monovarietais da Beira Baixa. *Revista de Ciências Agrárias*, XXIV, 1,2, 193-198.
- López-Villalta, L.C. 2003. Cuando iniciar la recolección de aceitunas en Jaén. *Agricultura: Revista Agropecuaria* 851: 338-343.
- Peres, M., Henriques, L. R., Simões-Lopes, P., & Pinheiro-Alves, M. 2009. Azeites da "Galega Vulgar" - efeito do loteamento e do armazenamento. Castelo Branco: Actas Portuguesas de Horticultura, 13,186-191.
- Peres, F., Martins, L.L., Mourato, M., Vitorino, C., Antunes, P. & Ferreira-Dias, S. 2016. Phenolic Compounds of 'Galega Vulgar' and 'Cobrançosa' Olive Oils along Early Ripening Stages. *Food Chemistry*, 211, 51-58.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. 2013. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Analytical Methods*, 6 (1), 123-132.
- Regulamento de Execução (UE) N.º 1348/2013 DA COMISSÃO de 16 de dezembro de 2013 que altera o Regulamento (CEE) N.º 2568/91, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.
- Vaz-Freire, L., Gouveia, J., & Freitas, A. 2008. Analytical Characteristics of Olive Oils Produced by Two Different Extraction Techniques, in the Portuguese Olive Variety "Galega Vulgar". *Grasas y aceites*, 59, 260-266.



## Quadros e Figuras

**Quadro 1-** Acidez, índice de peróxido (IP), absorvâncias no ultravioleta (UV) e exame organolético (Mf-mediana do frutado; Md-mediana do defeito), por sistema de extração (média  $\pm$  desvio padrão, máximo e mínimo) (n-nº de amostras).

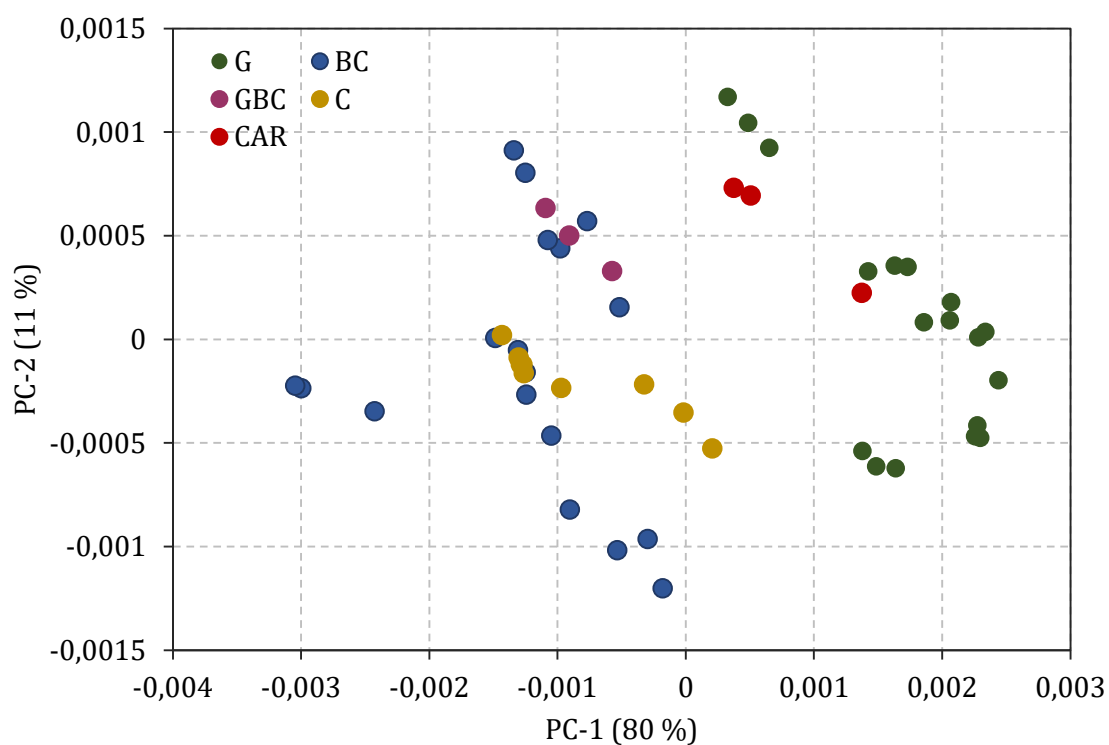
		Acidez (% ác.oleico)	IP (meqO <sub>2</sub> /kg)	Absorvâncias no UV		Exame Organolético	
				K232	K270	Mf	Md
<i>Hiller</i> n=10	Média $\pm$ DP	0,21 $\pm$ 0,01	6,89 $\pm$ 0,11	1,85 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01		
	Máx	0,41 $\pm$ 0,01	9,25 $\pm$ 0,12	2,08 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,04	4,5	1,8
	Mín	0,09 $\pm$ 0,01	2,76 $\pm$ 0,18	1,53 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,01	0	0
<i>Oliomio</i> n=10	Média $\pm$ DP	0,30 $\pm$ 0,00	8,61 $\pm$ 0,14	1,94 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01		
	Máx	0,77 $\pm$ 0,00	12,32 $\pm$ 0,10	2,28 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,01	2,5	3,5
	Mín	0,13 $\pm$ 0,02	3,74 $\pm$ 0,08	1,64 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,01	0	0
<i>Abencor</i> n=6	Média $\pm$ DP	0,06 $\pm$ 0,01	10,35 $\pm$ 0,10	1,80 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01		
	Máx	0,12 $\pm$ 0,01	13,26 $\pm$ 0,12	2,15 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,01	6,7	0
	Mín	0,04 $\pm$ 0,02	3,96 $\pm$ 0,12	1,37 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	1,8	0

**Quadro 2-** Teores em ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico dos azeites em estudo (média  $\pm$  desvio padrão, máximo e mínimo).

		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
<i>Hiller</i> n=10	Média $\pm$ DP	14,03 $\pm$ 0,22	3,38 $\pm$ 0,13	68,91 $\pm$ 0,23	10,71 $\pm$ 0,04
	Máx	14,08	3,71	72,93	13,82
	Mín	13,35	3,07	66,05	6,56
<i>Oliomio</i> n=10	Média $\pm$ DP	13,84 $\pm$ 0,20	3,29 $\pm$ 0,11	68,47 $\pm$ 0,23	11,41 $\pm$ 0,03
	Máx	15,12	3,87	72,27	16,51
	Mín	12,37	2,77	62,55	8,15
<i>Abencor</i> n=6	Média $\pm$ DP	14,24 $\pm$ 0,26	3,15 $\pm$ 0,01	69,71 $\pm$ 0,22	10,17 $\pm$ 0,04
	Máx	16,18	3,69	75,82	19,25
	Mín	13,45	2,28	60,09	5,06

**Quadro 3-** Ácidos gordos polinsaturados (AGP), fenóis totais e estabilidade oxidativa (EO) dos azeites extraídos em equipamento Abencor (de acordo com a cultivar, localidade e respetivo índice de maturação (IM)).

Cultivar	Localidade	IM	AGP	Fenóis	EO
‘Galega’	Idanha-a-Velha	5	5,54 ± 0,05	384,15 ± 4,49	35,0± 1,13
‘Galega’	Ladoeiro	4	6,04 ± 0,14	291,73 ± 13,61	17,4± 0,92
‘Bical’	Idanha-a-Velha	3	19,75 ± 0,04	304,81 ± 7,70	11,3± 0,78
‘Cordovil’	Idanha-a-Velha	1	13,91 ± 0,04	520,26 ± 11,23	13,4± 0,77
‘Cordovil’	Proença-a-Velha	1	11,29 ± 0,07	496,45 ± 6,03	17,7± 0,85
‘Carrasquenha’	Idanha-a-Velha	3	5,79 ± 0,08	928,93 ± 10,79	32,6± 1,67



**Figura 1-** Análise em componentes principais dos espectros dos azeites em estudo cuja cultivar é conhecida (BC- Bical e Cordovil; CAR- Carrasquenha; C-Cordovil; G- Galega; GBC- Galega/Bical e Cordovil)

## Reduction of acrylamide content in Californian-style black olives

Daniel Martín-Vertedor<sup>1,3\*</sup>, Antonio Fernández<sup>1</sup>, Manuel Cabrera-Bañegil<sup>1</sup>, Manuel Acevedo<sup>1</sup>, Ignacio Bravo<sup>1</sup>, Jonathan Delgado-Adámez<sup>1</sup>, Francisco Pérez-Nevado<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Technological Institute of Food and Agriculture (CICYTEX-INTAEX). Junta of Extremadura. Avda. Adolfo Suárez s/n 06007 Badajoz, Spain. daniel.martin@juntaex.es

<sup>2</sup>Department of Animal Production and Food Science, Area of Nutrition and Bromatology, University of Extremadura, Ctra. de Cáceres s/n 06071 Badajoz, Spain.

<sup>3</sup>Research Institute of Agricultural Resources (INURA), Avda. de la Investigación s/n,

### Abstract

Acrylamide had already been classified as a probable human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and it is formed when high-temperature is applied in Californian-style black olive. Thus, the aim of the study was to reduce the acrylamide formation in ripe olive through the implementation of certain changes during the elaboration process. The acrylamide content in oxidized black olives presented a wide variation both in olives and brine. In fact, the majority of samples, olives and brines, presented more than 250 ng/g. Those companies that applied a much more high sterilization thermal treatment in terms of time and temperature had more acrylamide in the final product. Furthermore, some “Hojiblanca” olives presented higher acrylamide content than “Manzanilla Cacereña”. Actions conducted to reduce acrylamide precursors, lowered its concentration after sterilization process. In all cases, the highest acrylamide concentration was found in stone olives and the lowest concentration was found in sliced ones. Also, the acrylamide concentration vary when the composition of brine changes.

Thus, the presence of CaCl<sub>2</sub> leads to an increase in acrylamide concentration and when the concentration of salt doubles, the amount of total acrylamide produced in olives increased. Therefore, there is a rapid diffusion by osmosis of precursors from the olive to brine because acrylamide is hydrosoluble, so it tends to move from olives to brine solution.

**Keywords:** oxidized black olives; sterilization; acrylamide; industry

### Introduction

Acrylamide, a heat-induced chemical contaminant, is formed during high-temperature processing of several carbohydrate rich foods such as potato chips, French fries, cookies, bakery products, breakfast cereal and coffee beans, among other. The European Food Safety Authority (EFSA) has confirmed that acrylamide in food increases the risk of cancer development in consumers (EFSA, 2015). Furthermore, acrylamide had already been classified as a probable human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) some years ago (IARC, 1994).

In the Scientific Opinion on acrylamide in food (EFSA, 2015), Californian-style table olives appeared as a potential source of acrylamide with levels comparable to other well-known food products containing acrylamide. The Californian-style is one of the most common procedures used to produce table olives. Firstly, green or turning color olives are oxidized and, then, they are subjected to a heat sterilization process (generally at 121-126° C) to assess the proper preservation. Recently, acrylamide generation has been associated to the high sterilization temperatures (Charoenprasert, & Mitchell, 2014; Tang et al., 2016).

Some conditions used in the production of table olives, added to sterilization temperatures, can affect the acrylamide production, such as the storage time, washing of the fruit after oxidization treatment or additives presence (Charoenprasert and Mitchell, 2014; Casado & Montaña, 2008; López-López et al., 2014). For that reason, the objective of the present work was to study the effect of different factors on acrylamide formation during the processing of Californian-style table olives in the industry.

## **Material and methods**

### **Samples**

Firstly, different random commercial brands of black ripe olives, the so-called “Californian-style”, were caught in triplicate from different industries located in Spain and Portugal over one year (2017). The cans contained 200 g of oxidized black olives which have gone through all the industrial technological process, including the sterilization one.

Secondly, olives from two varieties (‘Hojiblanca’ and ‘Manzanilla Cacereña’) were processed according to the Californian-style black ripe olive (Martín-Vertedor et al., 2020) in an industry located in northwest of Spain. Thus, 4 types of industrial scale trials were applied:

Trial 1) To study the effect of the variety studied, two olive varieties were chosen in an industry: “Hojiblanca” and “Manzanilla Cacereña”.

Trial 2) To study the effect of olives formats presentation in Hojiblanca variety prior to packing on acrylamide content. The following treatments have been studied: i) stone olives; ii) pitted olive; iii) sliced olives.

Trial 3) The influence of the addition or not of  $\text{CaCl}_2$  (Tetra Chemicals Europe, Helsingborg, Sweden) (2 g/l) in brine on the acrylamide formation before the sterilization process was studied with these experimental treatments: i) addition of  $\text{CaCl}_2$  in brine; ii) not addition of  $\text{CaCl}_2$  in brine.

Trial 4) The influence of the addition of NaCl (PANREAC, Barcelona, Spain) in brine on the acrylamide formation before the sterilization process was studied with these experimental treatments: i) addition of NaCl at 2% in brine; ii) addition of NaCl at 4% in brine.

The cans containers were sterilized and stored at room temperature before they were analyzed for acrylamide. All experiments were done by triplicate.

### **Extraction of acrylamide**

The following method was used for table olives and brine. To carry out the extraction of acrylamide in both matrices the method described by Bermudo et al. (2016) was followed with slight modifications: 2 g of ground and homogenized sample were weighed in an Erlenmeyer with 10 ml of milli-Q water. The samples were shaken during 60 min. The mix was centrifuged (Thermo Scientific Sorvall Legend XT/XF centrifuge, with a F13-14x50c carbon fiber rotor, Thermo Fischer Scientific, USA) at  $1,677 \times g$  at 4 °C during 30 min to facilitate the separation of the liquid fraction. Finally, the supernatant aqueous phase was filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon syringe filter (FILTER-LAB, Barcelona, Spain).

For the solid-phase extraction cartridges Telos PCX (200 mg/3ml) disposable extraction columns were used. The column was firstly conditioned with 4 ml of methanol and then 4 ml of Milli-Q water. The sample, 3 ml was injected in the cartridge and it was eluted with 3 ml of Milli-Q water in the cartridge Telos PRP (60mg/3ml) which was previously conditioned just as the first cartridges used. The sample (1 ml) picked up was

analyzed by LC-MS-MS. After that, 20 µL of 250 ng/g of acrylamide was added to the sample and it was analyzed again twice.

#### **HPLC/MS-MS analysis of acrylamide**

Samples were analyzed using an Agilent 1290 Infinity II liquid chromatograph (Agilent Technologies), coupled with an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies). The injection volume was 3 µL and elution was performed using a reversed-phase HPLC Zorbax XDB-C18 column (3.5 µm, 150 mm × 2.1 mm) at 30 °C. The system was operated isocratically with a flow rate of 0.25 mL/min of 95% solvent A (0.1% formic acid in Milli-Q water) and 5% solvent B (0.1% formic acid in methanol).

Acrylamide was ionized using the Agilent Jet Stream ion-source recorded in positive ion mode. The parameters of ion-source were set as follows: gas temperature: 340 °C, gas flow: 12 L h<sup>-1</sup>, nebulizer: 40 psi, sheath gas temp: 400 °C, sheath gas flow: 12 L h<sup>-1</sup>, capillary voltage: +2.5 kV, nozzle voltage: 300 V and delta EMV: 300.

#### **Statistical analysis**

The data analysis was accomplished by SPSS 17.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) to compare data from acrylamide content in the different experiments. Data were expressed as means ± SD and were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple range test.

### **Results and Discussion**

#### **Formation of acrylamide in commercial oxidized black olives**

Figure 1 shows the range of acrylamide concentration which is higher in brine than in olives analyzed. A lot of samples presented more than 250 ng/g of acrylamide. This concentration is within the range of the lowest acrylamide concentrations found in commercial canned black ripe olives by Charoenprasert, & Mitchell (2014). These researchers indicated that an acrylamide concentration of 250 ng/g is not serious for human health, considering the low consumption of canned black ripe olives compared to other food like fried potato products and chips, crackers, cookies, cakes and bread. They also found that most acrylamide in black ripe olives is formed during heat sterilization.

In general, our results revealed that a much more aggressive sterilization heat treatment in terms of time and temperature induces the acrylamide formation when the temperature is increased during heat sterilization. From the results of this study, it appears that the main reason why there are wide-ranging data on acrylamide levels in canned table olives is due to a range of different process  $F_0$  used by the olive canning industry.  $F_0$  of 13 min has been applied by canning industries reaching commercial sterility with a high degree of assurance, obtaining a healthier table olive due to acrylamide decreased by a 50 % of the initial level. Pérez-Nevado et al. (2018) obtained similar values of acrylamide content in olives elaborated in different industries.

#### **Acrylamide content according to the variety studied**

The acrylamide concentration was analyzed after sterilization process in two black olive varieties ("Hojiblanca" and "Manzanilla Cacereña") and its brines (Table 1). Results reveal that the amount of acrylamide of both varieties was high. Thus, "Hojiblanca" presented after industrial elaboration process higher acrylamide content than "Manzanilla Cacereña".

Therefore, the results obtained under this heading show that the variety that is recommended as the table olive processing industry is "Manzanilla Cacereña". Acrylamide was produced due to the high thermal sterilization in the final step of the elaboration process. In fact, some authors (Montaño et al., 2008; Pérez-Nevado et al., 2018) analyzed the content of acrylamide in olives of different varieties ("Manzanilla",

“Manzanilla Cacereña” and “Hojiblanca”), noting that the olives that were not sterilized as in the case of Spanish- green style had no acrylamide after the production process. The results are according to those obtained by other researchers (Montaño et al., 2008).

#### **Acrylamide content according to optional operations prior to packing**

The influence of different table olives formats presentation on acrylamide contents in “Hojiblanca” variety prior to packing, such as stone, pitted and sliced olives is shown in Table 2. The results showed that the highest acrylamide concentration was found in stone olives (33% more than sliced olives). These olives have compact format and a smaller contact surface of the olives with the government liquid. This means that in subsequent industrial operations that involve washing and olives transport by spray water, the diffusion of acrylamide-forming precursors outside the olives is lower, resulting in a final product with higher acrylamide concentration than other formats, such as pitted and sliced olives.

On the other hand, sliced olives is the format that showed the lowest concentration of this toxic substance, since, they have a greater contact surface with the liquid medium in the different stages during the industrial elaboration process, in relation to the other formats. Therefore, there is a greater diffusion of olive precursors that are released and diffused in the washing water, causing a lower final formation of acrylamide after sterilization process. This olives presentation format produced 15 and 33% less acrylamide compared to stone and pitted olives. Our results are in agreement with Montaño et al. (2008), corroborating that the oxidized sliced black olives had the lowest final concentration in acrylamide, after the sterilization process.

#### **Effect of brine composition on acrylamide formation in California-style black ripe olives**

The influence of the addition or not of  $\text{CaCl}_2$  in brine in the acrylamide formation before the sterilization process in table olives submitted to different format presentation is shown in Table 3. The presence of  $\text{CaCl}_2$  leads to an increase in acrylamide concentration, 20% in olives and more than 4% in brine. Stone olives submitted to calcium treatment had less acrylamide formation in brine. It means that calcium block the transference of acrylamide from olive to brine despite the hydrophobicity of this molecule. Thus, the presence of calcium ions in the saline solution results in higher levels of acrylamide content in the finished products (Charoenprasert & Mitchell, 2014). These researchers indicated that in general, calcium ions help to maintain the structural firmness, stability of the cell wall and the cellular turgor of the fruits, forming cross links between the pectin molecules, strengthening and preventing the collapse of the plant cells. Our data suggest that the presence of calcium in the brine helps to retain the precursors of acrylamide formation by improving the integrity of the cell wall and the levels of acrylamide in the finished products can be reduced by the omission of calcium in brine solutions.

On the other hand, the addition of NaCl to figure out if acrylamide production decreased, is showed in Table 4. As can be seen in the table, when the concentration of salt is the double, from 2 to 4%, the amount of total acrylamide produced in olives increased. In fact, the increase in stone olives were highest than the other formats presentation (around 15%). However, in pitted and sliced olives the increase in acrylamide was more than 9% with salt addition. Thus, the amount of acrylamide in brine decreased with stone olives and increased in pitted and sliced olives with salt addition. The effect on the acrylamide content was similar to that with the application of calcium but to a lesser extent. This may be because the salt also strengthens the olive cellular

membranes. No references or studies have been found to confirm or disprove the results obtained in our study with salt addition.

### **Conclusions**

The use of different measures to reduce acrylamide formation in Californian-style black olives is very effective if they are applied in the different stages of the elaboration process of table olives. Hojiblanca olives presented the highest values of acrylamide content. The use of slice olives, the non-use of calcium and the use of low salt concentration are measures to clearly provoke a significant reduction of acrylamide formation after sterilization process.

### **Acknowledgements**

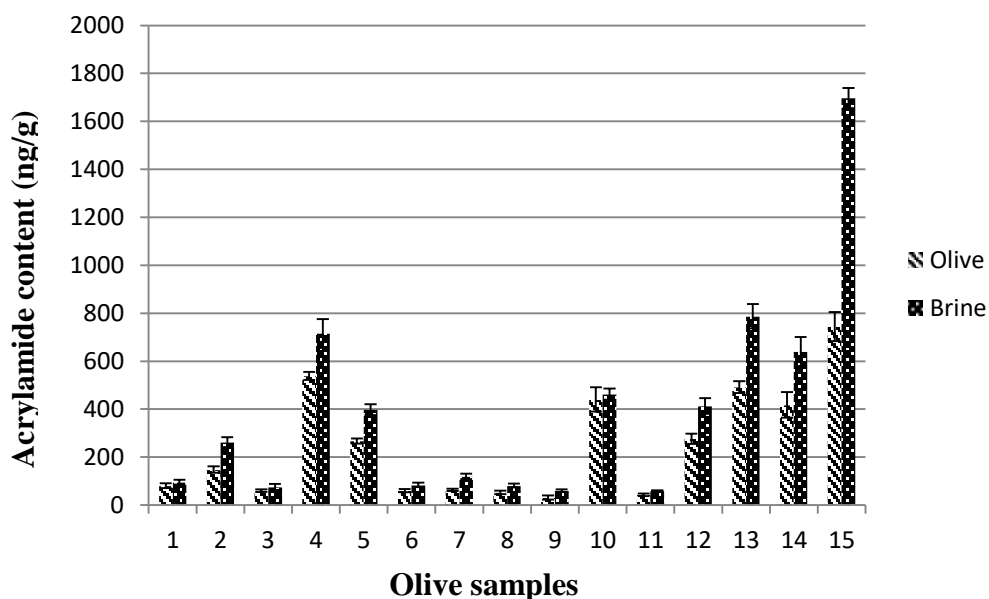
This research was supported by the European Social Fund and the Junta de Extremadura. The authors wish to thank to the Elemental and Molecular Analysis Service belonging to the Research Support Service of the University of Extremadura by the development of the method of determination of acrylamide and M<sup>a</sup> Dolores López Soto and Elena Rodríguez Paniagua for their help in the performance of this study. Manuel Cabrera-Bañegil thanks to the sponsorship of Comunidad Autónoma de Extremadura to Consejería de Economía e Infraestructuras and the co-financing of the Fondo Social Europeo (FSE) for the Grant to the formation of technologists in the year 2014 (TE14073).

### **References**

- Beyaz, A., Özkaya, M.T., & Içen, D. 2017. Identification of some Spanish olive cultivars using image processing techniques. *Scientia Horticulturae* 225: 286-292.
- Casado, F.J., Sánchez, A.H., & Montaña, A. 2010. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chemistry*, 119, 161-166.
- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. 2014. Influence of California-style black ripe olive processing on the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8716-8721.
- International Agency for Research on Cancer. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some industrial chemicals. Acrylamide (pp. 389-433, Vol. 60). Lyon. France: IARC.
- Montaña, A., Casado, F.J., Rejano, L., & Sánchez, A.H. 2008. Formación de acrilamida durante el tratamiento de esterilización de aceitunas tratadas con álcali. In CYTALIA XIII: Congreso anual en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Madrid, 9–11 April 2008.
- Scientific Opinion on acrylamide in food. 2015. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal*, 13(6), 4104.
- Scientific Report of EFSA. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. European Food Safety Authority.
- López-López, A., Beato, V. M., Sánchez, A. H., García-García, P., & Montaña, A. 2014. Effects of selected amino acids and water-soluble vitamins on acrylamide formation in a ripe olive model system. *Journal of Food Engineering*, 120, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.019>.
- Pérez-Nevado, F., Cabrera-Bañejí, M., Repilado, E., Martillanes, S., Martín-Vertedor, D. 2018. Effect of different baking treatments on the acrylamide formation and phenolic compounds in Californian-style black olives. *Food Control*, 94: 22-29.
- Martín-Vertedor, D., Fernández A., Hernández A., Arias-Calderón R., Delgado-Adámez J., Pérez-Nevado F. 2020. Acrylamide reduction after phenols addition to

Californian-style black olives. Food Control, 108, 106888.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106888>.

## Tables and Figures



**Figure 1-** Acrylamide content (ng/g) in commercial oxidized black olives and brine (1-15). Results are expressed as MEAN  $\pm$  standard deviation.

**Table 1-** Acrylamide content (ng/g) in ripe olive varieties. Different small letters in the same columns indicate significant statistical differences (Duncan's Test,  $p < 0.05$ ) among varieties. Different capital letters in the same column indicate significant statistical differences (Duncan's Test,  $p < 0.05$ ) between olives and brines for each variety. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of the three sample replicates.

Acrylamide (ng/g)	Manzanilla Cacerei	Hojiblanca
<b>Olive</b>	194.9 $\pm$ 8.2 <sup>aA</sup>	274.8 $\pm$ 15.2 <sup>bA</sup>
<b>Brine</b>	262.4 $\pm$ 10.3 <sup>aB</sup>	299.3 $\pm$ 20.1 <sup>bB</sup>

**Table 2-** Acrylamide content (ng/g) after submitted table olives to different formats of presentation (stone, pitted, and sliced). Results are expressed as mean  $\pm$  SD of replicates. Different small letters in the same columns indicate significant statistical differences between formats treatments (Tukey's Test,  $p < 0.05$ ). Different capital letters in the same columns indicate significant statistical differences between olives and brine.

[Acrylamide] (ng/g)	Olive Stone	Pitted olive	Sliced olive
<b>Olive</b>	236.0 $\pm$ 8.6 <sup>cNS</sup>	204.8 $\pm$ 9.6 <sup>bNS</sup>	178.0 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>
<b>Brine</b>	237.4 $\pm$ 7.3 <sup>c</sup>	205.4 $\pm$ 10.9 <sup>b</sup>	174.4 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>



**Table 3-** Acrylamide content (ng/g) after submitted table olives to the application of  $\text{CaCl}_2$ . Results are expressed as mean $\pm$ SD of replicates. Different small letters in the same columns indicate significant statistical differences between calcium treatments (Tukey's Test,  $p < 0.05$ ). Different capital letters in the same columns indicate significant statistical differences between olives and brine in each format.

[Acrylamide] (ng/g)		$\text{CaCl}_2$	Without $\text{CaCl}_2$
<b>Olives</b>	stone	$257.3 \pm 6.3^{bC}$	$236.0 \pm 8.6^{aC}$
	pitted	$235.0 \pm 7.1^{bB}$	$204.8 \pm 9.6^{aB}$
	sliced	$213.5 \pm 9.6^{bA}$	$178.0 \pm 6.9^{aA}$
<b>Brine</b>	stone	$289.4 \pm 8.9^{bC}$	$237.4 \pm 7.3^{aC}$
	pitted	$267.0 \pm 7.5^{bB}$	$205.4 \pm 10.9^{aB}$
	sliced	$229.0 \pm 6.0^{bA}$	$174.4 \pm 8.0^{aA}$

**Table 4-** Acrylamide content (ng/g) after submitted table olives to the application of  $\text{NaCl}$ . Results are expressed as mean $\pm$ SD of replicates. Different small letters in the same columns indicate significant statistical differences between salt treatments (Tukey's Test,  $p < 0.05$ ). Different capital letters in the same columns indicate significant statistical differences between olives and brine in each format.

[Acrylamide] (ng/g)		4% $\text{NaCl}$	2% $\text{NaCl}$
<b>Olives</b>	stone	$277.0 \pm 9.4^{bC}$	$236.0 \pm 8.6^{aC}$
	pitted	$215.4 \pm 8.9^{bB}$	$204.8 \pm 9.6^{aB}$
	sliced	$197.1 \pm 7.3^{bA}$	$178.0 \pm 6.9^{aA}$
<b>Brine</b>	stone	$305.3 \pm 10.9^{bC}$	$237.4 \pm 7.3^{aC}$
	pitted	$267.5 \pm 8.6^{bB}$	$205.4 \pm 10.9^{aB}$
	sliced	$202.5 \pm 7.9^{bA}$	$174.4 \pm 8.0^{aA}$

## **Caracterização de Azeites Virgens da Região das Beiras e Serra da Estrela**

Cecília Gouveia<sup>1</sup>, Ofélia Anjos<sup>1,2,3</sup>, Catarina Lourenço<sup>1</sup> & Fátima Peres<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Quinta Senhora de Mércules, Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, [cgouveia@ipcb.pt](mailto:cgouveia@ipcb.pt)

<sup>2</sup> Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, Castelo Branco, Portugal

<sup>4</sup> LEAF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, [fperes@ipcb.pt](mailto:fperes@ipcb.pt)

### **Resumo**

Este trabalho caracteriza, preliminarmente, 40 amostras de azeite virgem recolhidas na Região das Beiras e Serra da Estrela, durante a campanha 2017/18, no âmbito do Projeto “Promoção e Valorização de Azeites de Montanha”. Para efetuar esta caracterização por métodos rápidos, o projeto dotou-se de pacotes de calibração para equipamento de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) da Bruker, resultando na utilização de um método não poluente e com capacidade para analisar um elevado número de amostras em tempo útil para a tomada de decisões. Face aos critérios químicos de qualidade, 95% dos azeites analisados estão conforme a categoria de “azeite virgem extra”. A composição em ácidos gordos exhibe azeites com teores médios de ácido oleico, linoleico e palmítico de 78, 9 e 11 %, respetivamente.

**Palavras-chave:** acidez, absorvâncias no UV, ácidos gordos, índice de peróxido, NIR

### **Abstract**

This work aims to present a characterization of 40 virgin olive oils samples produced in “Beiras and Serra da Estrela” Region during the 2017/18 harvest, within the scope of the "Promotion and Valorisation of Mountain Olive Oil" Project. The project was provided with calibration packages for Bruker's Near Infrared (NIR) Spectroscopy equipment to perform this characterization, using a fast methodology, which results in the use of a non-polluting method able to analyse a high number of samples in real time to decision make. From the point of view of chemical quality criteria, 95% of the samples are in accordance to the category of extra virgin olive oil. Fatty acid composition presents olive oils with medium contents of oleic, linoleic and palmitic acids of 78, 9 and 11%, respectively.

**Keywords:** acidity, fatty acids, NIR, peroxide value, UV absorbances.

### **Introdução**

A sub-região Beiras e Serra da Estrela é constituída pelo distrito da Guarda, excepto os concelhos de Aguiar da Beira e Vila Nova de Foz Côa, e pelos concelhos de Belmonte, Covilhã e Fundão, representando uma superfície territorial de 6.305 km<sup>2</sup> (22% do território da Região Centro) (CIMBSE, 2018) e produzindo cerca de 35% do total de azeitona da Região Centro (INE, 2016). Nesta região, predominam olivais com mais de 50 anos, de sequeiro, onde a cultivar ‘Galega Vulgar’ é a mais utilizada, embora coexista

com as cultivares ‘Cornicabra’, ‘Madural’ e ‘Cobrançosa’, entre outras (AGRILOGIS, 2014).

Os sistemas tradicionais enfrentam desafios importantes, para os quais é fundamental a colaboração com as unidades de I&D. Consequentemente, a implementação de tecnologias e de modos de produção mais sustentáveis poderão ser fomentados através da formação e aconselhamento de um número elevado de olivicultores e industriais. O projeto “Promoção e Valorização de Azeites de Montanha” pretende contribuir para melhorar fatores críticos de competitividade, através da investigação e da inovação, de forma a incrementar a qualidade e a tipicidade dos produtos provenientes do olival. Neste sentido, dotou-se de pacotes de calibração para equipamento de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) da Bruker, podendo, assim, fornecer um serviço útil aos olivicultores. Trata-se de um método não poluente e com capacidade de análise de um elevado número de amostras em tempo útil para a tomada de decisões. Esta metodologia permite, ainda, informar sobre os critérios químicos de qualidade, orientar a rotulagem nutricional e suspeitar de alguns tipos de adulteração. Vários estudos têm validado a utilização destas metodologias em diversos produtos alimentares, com por exemplo no azeite (Sato et al., 1998; Gülgün et al., 2001; Mailer, 2004; Garrido-Varo et al., 2017).

O presente trabalho apresenta um estudo preliminar usando um equipamento de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) na caracterização química de 40 azeites com origem na Região das Beiras e Serra da Estrela, obtidos na campanha 2017/18.

### **Material e métodos**

Selecionaram-se 40 amostras de azeites da campanha de 2017/18, produzidos em 11 dos 15 concelhos da Região da Comunidade Intermunicipal das Beiras e Serra da Estrela (Quadro 1). Que foram analisados por Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) (MPA, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado.

A acidez, o índice de peróxido, as absorvâncias a 270 e 232 nm, e os ácidos gordos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) foram avaliados por calibrações comerciais (B-Olive-Oil, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). Foram realizadas análises pelos métodos oficiais (Reg. (UE) N° 1348/2013) em todas as amostras em que se verificou não conformidade com a categoria de azeite virgem extra.

A informação espectral foi recolhida em amostras de azeite, previamente preparadas e filtradas segundo a Norma Portuguesa NP-896/85, obtidos à temperatura de 50 °C, em modo de absorvância e no comprimento de onda de 12000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e 32 *scans*.

O tratamento dos dados foi efetuado pelos *softwares* OPUS®, versão: 7.5.18 (Bruker Optik, Alemanha) e XLSTAT para a análise em componentes principais.

### **Resultados e discussão**

Tendo em conta, unicamente, a avaliação química (Quadro 2), verifica-se que todas as amostras têm valores médios de acidez, índice de peróxido e absorvâncias no ultravioleta ( $K_{270}$  e  $K_{232}$ ) muito baixos, com exceção de uma amostra da Covilhã (acidez = 1,22 %) e outra de Figueira de Castelo Rodrigo ( $K_{270}$  = 0,33), que não estão conforme a categoria de azeite virgem extra (Reg. (UE) N° 1348/2013). Tratando-se de azeites recolhidos aleatoriamente, os resultados são bons para a Região, dado que 95% das amostras estão conforme esta categoria, pelo menos em relação aos critérios químicos. A

categoria final destes azeites será confirmada pelo exame organoléptico e, no caso dos “azeites virgem extra”, com a avaliação do conteúdo de ésteres etílicos.

O teor em ácidos gordos combinados nos triacilgliceróis caracteriza os azeites virgens. A composição, em ácidos gordos, dos azeites virgens depende essencialmente de fatores genéticos e climáticos. Os perfis em ácidos gordos têm permitido a caracterização dos azeites de diversas cultivares e de várias regiões (Gouveia, 1997; Krichène et al., 2010; Sánchez de Medina et al., 2015). Os resultados percentuais dos ácidos gordos avaliados, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3 (Quadro 3), encontram-se dentro dos valores referidos no Regulamento (UE) N° 1348/2013. Por seu turno, a análise em componentes principais dos ácidos gordos em estudo (Fig. 1), explica 83,6 % da variação total. Verifica-se que as amostras formam três grupos distintos, de acordo com a percentagem em ácidos gordos: monoinsaturados (C18:1), polinsaturados (C18:3 e C18:2) e saturados (C16:0 e C18:0). De acordo com estudos anteriores, é possível associar a estes três grupos: os azeites ricos em ácidos gordos saturados, em que a cultivar ‘Galega vulgar’ é a predominante; os azeites ricos em ácido oleico, predominando a cultivar ‘Carrasquinha’, e os azeites ricos em polinsaturados, com predominância na cultivar ‘Cornicabra’ (Peres et al., 2005; Henriques et al., 2005). A importância dos ácidos gordos não se circunscreve aos teores em polinsaturados, monoinsaturados ou saturados, ou às relações que se podem estabelecer entre eles, mas prende-se também com a avaliação sensorial, devido à produção de compostos voláteis pela via da lipoxigenase (LOX) (Angerosa et al., 2004; Campestre et al., 2017). Assim, a presença de maior ou menor quantidade de ácidos gordos C18:1 e C18:2, substratos da LOX, irá ditar não só as características nutricionais dos azeites, bem como a formação de compostos relevantes para o seu perfil sensorial.

## Conclusões

Este estudo preliminar permitiu selecionar as amostras de azeite que serão submetidas a exame organoléptico, de forma a contribuir para a caracterização dos azeites produzidos na Região das Beiras e Serra Estrela. Além disso, permitem ter uma indicação do intervalo de valores da composição em ácidos gordos majoritários para os azeites desta Região.

## Agradecimentos

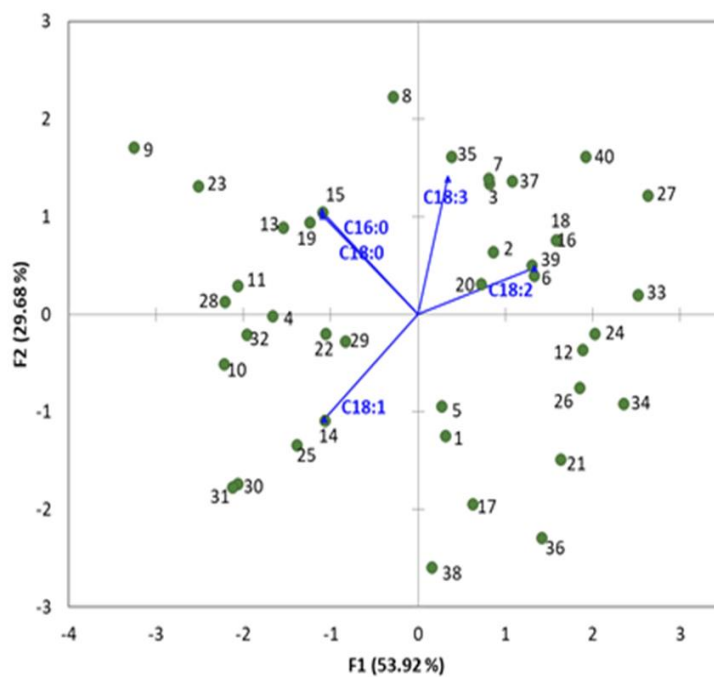
O presente trabalho foi financiado pelo projeto CENTRO-01-0246-FEDER-000004, intitulado “Promoção e Valorização de Azeites de Montanha”. Aos Centro de Estudos Florestais (CEF) e Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF), unidades de investigação financiadas pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (UID/AGR/UI00239/2019) e (UID/AGR/04129/2019), respetivamente.

## Referências

- AAPIM. 2014. “A caracterização do olival da Beira Interior”. Projeto AGRIOLOGIS – Associação de Agricultores Para Produção Integrada de Frutos de Montanha.
- CIMBSE. 2018. Território Intermunicipal Beiras e Serra da Estrela. <https://cimbse.pt/territorio-intermunicipal-beiras-e-serra-da-estrela/> acedido em 6 de Junho de 2018,
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality Journal of Chromatography A, 1054 (1-2): 17-31.

- Campestre, C., Angelini, G., Gasbarri, C. & Angerosa, F. 2017. The Compounds Responsible for the Sensory Profile in Monovarietal Virgin Olive Oils. *Molecules*, 22: 1833.
- Garrido-Varo, U., Sanchez, M. T., Haba M. J., Torres, I. & Perez-Marin, D. 2017. Fast, Low-Cost and Non-Destructive Physico-Chemical Analysis of Virgin Olive Oils Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Sensors*. 17: 2642
- Gouveia, J.M.B. 1997. Comparación de los Aceites de Oliva de los Cultivares Cobrançosa, Blanqueta, Azeiteira y Picual con los del cv Galega vulgar, Producidos en el Norte del Alentejo. *Olivae*, 66: 34-45
- Gülğün, Y., R.L. Wehling, & S. L. Cuppett. 2001. Method for Determining Oxidation of Vegetable Oils by Near-Infrared Spectroscopy, 78:495–502
- Henriques, L., Peres, M.F. Vitorino, M.C. & Pinheiro-Alves, M.C. 2005. Composição em triacilgliceróis de azeites monovarietais da Beira Interior. Atas do 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu. *Em cd-rom*.
- INE, 2016. Inquérito anual à produção de azeite. Instituto Nacional de Estatística
- Krichène, D., Allalout, A., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Zarrouk, M. 2010. Fatty acids, volatiles, sterols and triterpenic alcohols of six monovarietal Tunisian virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(3): 400-409.
- Mailer, R. J. 2004. Rapid evaluation of olive oil quality by NIR reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81: 823-827
- NP-896. 1985. Gorduras e óleos comestíveis - preparação de amostras para laboratório. *Diário da República*, III Série, Nº 298.
- Peres, M.F., Henriques, L.R., Vitorino, M.C., Simões-Lopes, P., Gouveia, C. & Pinheiro-Alves, M.C. 2005. Characterization of monovarietal virgin olive oil of “Beira Alta” Region (Portugal). Atas do 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu. *Em cd rom*.
- Regulamento de Execução (UE) Nº 1348/2013 da Comissão Europeia. 2013. Relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia*. L338: 31-67.
- Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. 2015. The effect of genotype and ripening index on the phenolic profile and fatty acids composition of virgin olive oils from olive breeding programs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(7): 954-966.
- Sato, T., Uezono, I., Morishita, T. & T. Tetsuka. 1998. Non Destructive Estimation of Fatty Acid Composition in Seeds of *Brassica napus* L. by Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75:1877–1881.

## Quadros e Figuras



**Figura 1** – Análise em Componentes Principais da composição em ácidos gordos maioritários das amostras em estudo.

**Quadro 1** - Distribuição do número de amostras recolhidas na Região da Comunidade Intermunicipal Beiras e Serra da Estrela, por concelho.

<b>Concelho</b>	<b>Nº de Amostras</b>
Belmonte	1
Celorico da Beira	3
Covilhã	2
Figueira de Castelo Rodrigo	5
Fornos de Algodres	2
Fundão	2
Gouveia	3
Guarda	3
Meda	10
Pinhel	8
Seia	1
<b>Total</b>	<b>40</b>

**Quadro 2** – Resultados dos parâmetros químicos de qualidade das amostras em estudo.

<b>Parâmetro Analítico</b>	<b>Média <math>\pm \sigma</math></b>	<b>Máx.</b>	<b>Mín.</b>
<b>Acidez (% ác. oleico)</b>	0,28 $\pm$ 0,18	1,22	0,10
<b>IP (meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>)</b>	6,06 $\pm$ 2,01	13,22	2,99
<b>K<sub>270</sub></b>	0,18 $\pm$ 0,04	0,33	0,13
<b>K<sub>232</sub></b>	1,85 $\pm$ 0,21	2,33	1,47

**Quadro 3** – Composição em ácidos gordos maioritários das amostras em estudo.

Ácidos Gordos	Média $\pm \sigma$	Máx.	Mín.
C16:0 (%)	11,68 $\pm$ 1,27	14,84	9,08
C18:0 (%)	2,59 $\pm$ 0,53	4,06	1,56
C18:1 (%)	72,66 $\pm$ 2,75	77,05	67,84
C18:2 (%)	9,24 $\pm$ 2,98	14,63	4,42
C18:3 (%)	0,54 $\pm$ 0,09	0,78	0,34



## **Análise comparativa de acidez em ácido oleico e perfil de ácidos graxos de azeites produzidos no Brasil, Argentina e Espanha**

Thiago Della Nina Idalgo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal Farroupilha, Alameda Santiago do Chile, 195, N. Sr<sup>a</sup>. de Lourdes, CEP 97050-685, Santa Maria, RS, Brasil, thiago.idalgo@iffarroupilha.edu.br

### **Resumo**

A olivicultura é uma excelente alternativa de produção e de geração de lucro e tem alto potencial de sucesso nas condições edafoclimáticas dos estados do Rio Grande do Sul (RS) e Minas Gerais (MG), no Brasil. Enquanto na Bacia do Mediterrâneo a biogénese do azeite se dá em um período de 5 a 6 meses de temperaturas em decréscimo, nas regiões produtoras do RS e MG esta ocorre no período de altas temperaturas. Ainda que a produção de azeite nessas regiões seja incipiente, procura-se obter óleos de composição comparável aquelas obtidas em países tradicionalmente produtores para suprir a demanda, atendida sobretudo por importação de produto europeu. Com o objetivo de verificar a acidez (em ácido oleico) e o perfil de ácidos gordos dos azeites produzidos no Brasil em comparação com outros países, foi realizado um levantamento bibliográfico focado na cultivar Arbequina (de origem espanhola). Os dados foram compilados e comparados com os parâmetros exigidos pelo padrão do *Codex Alimentarius* FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil, para Azeites de Oliva Extra Virgens (AOEV). Foram verificados trabalhos oriundos do Brasil, Argentina e Espanha. Os azeites produzidos no RS apresentaram valores próximos do limite superior para o ácido gordo saturado C16:0 e insaturado C16:1. A acidez de AOEV obtidos em trabalhos no RS foi de até 0,75%, próximo ao limite estabelecido pela ANVISA (0,8%). Os azeites produzidos no Brasil apresentaram perfil de ácidos gordos semelhantes àqueles produzidos na Espanha e na Argentina. A partir desses estudos verificou-se que a produção brasileira de azeites, ainda que insipiente, atende os padrões de composição exigidos para AOEV.

**Palavras-chave:** *Olea europaea*, Arbequina, olivicultura, AOEV.

### **Abstract**

Olive cultivation is an excellent alternative for production and income generation and has high potential for success in the soil and climatic conditions of the states of Rio Grande do Sul (RS) and Minas Gerais (MG), Brazil. While in the Mediterranean Basin the biogenesis of olive oil occurs in a period of 5 to 6 months of decreasing temperatures, in the producing regions of RS and MG this occurs in the period of high temperatures. Although the olive oil production in these regions is incipient, it is sought to obtain oils of comparable composition of those obtained in countries traditionally producing olive oil to supply the demand, mainly attended by import of European product. In order to verify the acidity and the fatty acid profile of the oils produced in Brazil in comparison with other countries, a bibliographical survey was carried out focusing on the cultivar Arbequina (of Spanish origin). The data were compiled and compared to the parameters required by the Standard of the FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) and ANVISA in Brazil for Extra Virgin Olive Oil (EVOO). Studies were carried out from Brazil, Argentina and Spain. The oils produced in RS presented values close to the upper limit for the saturated fatty acid C16:0 and unsaturated C16:1. The acidity of

EVOO obtained in works in RS were up to 0.75%, close to the limit established by ANVISA (0.8%). The oils produced in Brazil presented a fatty acid profile similar to those produced in Spain and Argentina. From these studies, it was verified that the Brazilian production of olive oils, even if it is very low, meets the composition standards required for EVOO.

**Keywords:** *Olea europaea*, Arbequina, olive, EVOO

### **Introdução**

As oliveiras (*Olea europaea* L.) estão amplamente distribuídas pelo sul da Europa, norte da África e na Península Ibérica, e atualmente, aproximadamente 98% das oliveiras são cultivadas nos países da Bacia do Mediterrânea (Torres et al., 2017). Espanha, Itália e Grécia, juntos, produzem cerca de 80% do azeite do mundo (IOC, 2016). Azeitonas e azeite são produtos encontrados com frequência na mesa dos brasileiros. Devido à pequena área de plantação e a produções insignificantes no Brasil, a importação tem sido a alternativa para suprir a demanda interna (Wrege et al., 2009).

A área cultivada com oliveiras no Brasil é ainda pequena, mas em crescimento, ocupando aproximadamente 1300 ha, resultado de projetos de expansão da produção de azeites (Torres et al., 2017). Os estados de Minas Gerais (MG) e Rio Grande do Sul (RS) correspondem a maior área de cultivo e de produção de azeites do Brasil.

A olivicultura é uma alternativa para a produção em pequenas propriedades com foco na fruticultura, sobretudo no Estado do Rio Grande do Sul, situado entre os paralelos 30 e 45° S (Coutinho et al., 2015). O município de Caçapava do Sul teve no ano de 2003 o primeiro olival instalado, dando início ao cultivo e programas de pesquisa e fomento de órgão públicos de investigação como EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMATER, 2015).

A acidez é um parâmetro físico-químico importante na classificação do azeite, esse atributo está associado aos componentes naturais e é característico da variedade, estágio de maturação da azeitona, do micro clima da região produtora e das características do terreno em que a oliveira está localizada e das condições climáticas a que foi submetido o olival durante aquela safra (Wrege et al., 2009; Mello & Pinheiro, 2012). Índices de acidez baixos indicam que os azeites são provenientes de uma matéria prima de boa qualidade (Mello & Pinheiro, 2012). Os ácidos graxos que podem compor o azeite, segundo o *Codex Alimentarius* FAO, são C 14:0, C 16:0, C 16:1, C 17:0, C 17:1, C 18:0, C 18:1, C 18:2, C 18:3, C 20:0, C 20:1, C 22:0 e C 24:0.

A cultivar Arbequina, junto com cultivares como Arbosana e Picual, são amplamente utilizadas em olivais no RS, apreciada pela precocidade, elevada produtividade, bom rendimento e excelente qualidade do azeite (Cappellaro et al., 2009). Outra característica dos azeites produzidos a partir da variedade Arbequina é a considerável concentração em ácidos gordos essenciais, em especial, ácido linoleico (Mello & Pinheiro, 2012).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar, através de levantamento bibliográfico, a acidez e o perfil de ácidos gordos dos azeites produzidos no Brasil em comparação com outros países com enfoque na cultivar Arbequina.

### **Material e métodos**

Para a realização do presente estudo foram compilados dados de artigos publicados através de um levantamento bibliográfico pela ferramenta de busca da “Periódicos Capes” (site periódicos Capes) com enfoque na cultivar Arbequina. Os

parâmetros de busca, em português, foram: “acidez do ácido oleico”, “perfil de ácidos graxos” e cultivar “Arbequina”.

A cultivar arbequina é de origem espanhola, apresenta considerável resistência ao frio, e é autocompatível. Apresenta reduzido vigor da planta, permitindo maior adensamento de cultivo (Cappellaro et al., 2009).

Os artigos que contemplaram avaliações de perfil de ácidos graxos e acidez do ácido oleico para a cultivar Arbequina foram selecionados, independentemente do objetivo e de demais avaliações que os autores haviam proposto. Os dados foram compilados e comparados com os parâmetros exigidos pelo padrão do *Codex Alimentarius* FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, CODEX STAN 33, 1981) e correspondentes à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil, para Azeites de Oliva Extra Virgens (AOEV) quanto aos padrões percentuais de: acidez do ácido oleico (AAO), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1 – ômega 9), ácido linoleico (C18:2 – ômega 6) e ácido linolénico (C18:3 – ômega 3).

Os dados comuns aos trabalhos foram submetidos ao  $\chi^2$  pelo programa estatístico Past, a 5% de significância verificando a dissimilaridade entre os dados apresentados nos trabalhos e frente ao padrão mínimo e máximo do *Codex Alimentarius* FAO.

## Resultados e Discussão

Os dados obtidos no levantamento estão apresentados na Tabela 1, com as médias apresentadas nos trabalhos. Foram encontrados 6 (seis) artigos que avaliaram os parâmetros estabelecidos na busca com a cultivar Arbequina, realizados na Argentina, Espanha, Brasil e em conjunto entre os dois últimos. Os trabalhos de Ballus et al. (2014) e Ceci et al. (2017) foram realizados em dois anos consecutivos, os demais, avaliaram colheitas de somente um ano em um ou mais locais.

Não houve diferença significativa entre as proporções de ácidos gordos obtidas em todos os trabalhos, nem entre estas e os limites mínimos e máximos exigidos pelo *Codex Alimentarius* FAO ( $\chi^2=96,989$ ,  $p=0,5685$ ). O mesmo ocorreu para a acidez (AAO).

Os azeites produzidos no RS apresentaram valores próximos do limite superior para o ácido gordo saturado C16:0 e insaturado C16:1. A acidez de AOEV obtidos em trabalhos no RS foi de até 0,75%, próximo ao limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* FAO. A partir desses estudos verificou-se que a produção brasileira de azeites, ainda que insipiente, atende os padrões de composição exigidos para AOEV.

Ainda que outros parâmetros sejam importantes para se avaliar qualidade de azeites, alterações no perfil de ácidos gordos e a acidez não foram verificadas, com a metodologia utilizada, alterações significativas na composição entre os locais de produção da oliveira. Segundo Borges et al. (2017) a latitude e a temperatura afetam a composição de ácidos gordos da cultivar Arbequina. Em regiões próximas geograficamente, de clima semelhante, essa diferença não é observada (Mello & Pinheiro, 2012).

## Conclusões

Os azeites produzidos no Brasil apresentaram perfil de ácidos gordos semelhantes àqueles produzidos na Espanha e na Argentina. A partir desses estudos verificou-se que a produção brasileira de azeites, ainda que insipiente, atende os padrões de composição exigidos para AOEV, podendo ser explorada a sua produção no Brasil, incentivando assim, uma alternativa em fruticultura para pequenos produtores.

**Referências**

- Ballus, C.A., Meinhart, A.D., Campos Junior, F.A.de S., Silva, L.F.de O. da, Oliveira, A.F. de & Godoy, H.T. 2014. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Research International* 62 :74–83.
- Borges, T.H., Pereira, J.A., Cabrera-Vique, C., Lara, L., Oliveira, A.F. & Seiquer, I. 2017. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry* 215:454–462.
- Cappellaro, T.H., Coutinho, E.F., Ribeiro, F.C., Araújo, F.A. de & Faria, M.A.R. de. P. 41-48. Cultivares. In.: Enilton Fick Coutinho, E.F., Ribeiro, F.C. & Cappellaro, T.H. 2009. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.). *Sistemas de Produção* 16. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.
- Ceci, L.N., Mattar, S.B. & Carelli, A.A. 2017. Chemical quality and oxidative stability of extra virgin olive oils from San Juan province (Argentina). *Food Research International* 100:764–770.
- Coutinho, E.F., Jorge, R.O., J.A., Haerter, Costa, V.B. 2015. Oliveira: aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil. Embrapa, Brasília, 181 p.
- EMATER. 2015. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural –. Disponível em: <http://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201606/22153712-1449767470-olivicultura-no-rs-tailor-25-11-2015.pdf>.
- IOC. 2016. World olive oil figures. Disponível em: < <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>.
- Mello, L.D. & Pinheiro, M.F. 2012. Aspectos de azeites de oliva e de folhas de oliveira. *Alimentos e Nutrição* 23:537-548.
- Silva, L.F. de O. da, Oliveira, A.F. de, Pio, R., Alves, T.C. & Zambon, C.R. 2012. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. *Bragantia* 71:202-209.
- CODEx STAN 33. Standard for olive oils and olive pomace oils. 2015. Codex Alimentarius, International Food Standards 33, 1981.
- Torres, M., Pierantozzi, P. Searles, P., Rousseaux, M.C., García-Inza, G., Miserere, A., Bodoira, R., Contreras, C & Maestri, D. 2017. Olive Cultivation in the Southern Hemisphere: Flowering, Water Requirements and Oil Quality Responses to New Crop Environments. *Frontiers in Plant Science* 8:1-12.
- Wrege, M.S., Coutinho, E.F., Steinmetz, S., Reisser Júnior, C., Almeida, I.R. de, Matzenauer, R. & Radin, B. 2009. Zoneamento Agroclimático para Oliveira no Estado do Rio Grande do Sul. Documentos 259. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.

## Tabelas e Figuras

**Tabela 1.** Valores percentuais médios para a acidez (AAO), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1 – Ômega 9), ácido linoleico (C18:2 – Ômega 6) e ácido linolénico (C18:3 – Omega 3), obtidos nos artigos pesquisados.

AUTORES	LOCAL	AAO	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
----- % -----								
Mello & Pinheiro (2012)	BR (RS)	0,38*	18	2,29	1,63	59,9	11,8	0,76
	BR (RS)	0,4	19	3,15	1,53	57,1	13,6	0,57
Silva et al. (2012)	BR (MG)	0,2	14,1	1,8	0,1	73,5	9,6	0
Oliveira et al. (2012)	BR (MG)	-	7,02	2,43	0,58	61,3	10,58	0,63
Ballus et al. (2014)	BR (MG)	-	11,1	0,6	2,06	77,8	6,78	0,6
	BR (MG)	-	9,8	0,69	2,02	81	4,65	0,65
Ceci et al. (2017)	ARG1	0,275	18,62	2,515	1,67	57,445	18,075	0,765
	ARG2	0,245	17,695	2,12	1,66	59,49	16,56	0,685
Borges et al. (2017)	SPAIN1	0,15	11,99	1,05	1,92	75,22	8,04	0,58
	SPAIN2	0,18	17,43	1,89	1,81	64,09	13,17	0,56
	SPAIN3	0,25	14,14	1,08	2,02	71,66	9,51	0,46
	SPAIN4	0,32	16,98	1,59	1,89	63,12	14,76	0,55
	SPAIN5	0,15	17,34	1,51	1,82	63,85	13,77	0,56
	SPAIN6	0,24	15,19	1,64	1,78	66,69	13,24	0,6
	SPAIN7	0,16	19,55	1,55	1,61	64,66	11,04	0,55
	SPAIN8	0,16	9,44	0,58	2,13	79,68	6,56	0,46
	SPAIN9	0,18	13,97	1,13	1,93	70,6	10,82	0,48
	BR (RS)	0,75	19,08	3,16	1,56	64,29	10,49	0,51
	BR (MG)	0,15	14,15	1,72	1,44	70,64	10,29	0,69
	<b>MÉDIA</b>	<b>0,26</b>	<b>14,98</b>	<b>1,71</b>	<b>1,64</b>	<b>67,48</b>	<b>11,23</b>	<b>0,56</b>
	<i>Codex min</i>	0,8	7,5	0,3	0,5	55	3,5	0
	<i>Codex max</i>	0,8	20	3,5	5	83	21	1

## **Utilización de la fluorescencia intrínseca de las aceitunas Ascolana Tenera en combinación con quimiometría para la monitorización del proceso de elaboración**

Manuel Cabrera-Bañegil<sup>1</sup>, Daniel Martín-Vertedor<sup>2</sup>, Enrico Maria Lodolini<sup>2</sup> & Isabel Durán-Merás<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avda de Elvas S/N 06006, Badajoz, España. manuelcb@unex.es

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (CICYTEX-INTAEX). Junta of Extremadura. Avda Adolfo Suárez S/N 06007 Badajoz, España.

### **Resumen**

En la región de Marche (Italia) se cultiva una variedad de aceituna de gran calibre que pertenece a la “Denominazione di Origine Protetta (DOP) L’Oliva Ascolana del Piceno”. Uno de los mayores inconvenientes de esta variedad es que es sensible al molestar, por lo que requiere muchas precauciones durante la recolección, transporte y elaboración. El disponer de herramientas que permitan un control en línea, rápido y sin necesidad de pretratamientos de las muestras supone un gran reto para la industria. En este caso para monitorizar su elaboración se propone un método de fluorescencia en el que se registran múltiples espectros de emisión, que con el conjunto de muestras forman un cubo de datos, cuyo posterior análisis se hace mediante algoritmos matemáticos como Análisis de Factores Paralelos (Parallel Factor Analysis, PARAFAC). Se analizaron muestras de aceitunas en fresco, durante el proceso de cocido, tras los lavados, y durante y tras la fermentación. Cuando se analizaron por grupos de dos por representación de las puntuaciones (scores) en los tres ejes del espacio, PARAFAC permitió su clasificación en función del proceso de elaboración en cuanto al contenido en compuestos fluorescentes. Por tanto, a la vista de los resultados, se abre la posibilidad de la utilización de la fluorescencia en combinación con herramientas quimiométricas para la realización de un seguimiento del proceso de elaboración con el objetivo de estandarizar el proceso y calidad de las aceitunas.

**Palabras clave:** PARAFAC, aceitunas Ascolana Ternera frescas, cocidas, fermentadas, calidad.

### **Abstract**

In the Marche region (Italy) there is a high size olive variety which belong to the PDO “Oliva Ascolana del Piceno”. One of main disadvantage of this olive variety is its high sensitivity and the apparition of black spots when the olive is transported and elaborated. On line analytical tool which allowed a rapid and simple analysis is a huge challenge for the industry. The decomposition of excitation emission matrices of fluorescence proposed method allowed the monitoring of elaboration. Fresh olive samples, lye and wash olive samples and fermented olive samples were analysed. When the olive samples were analysed in pairs, the representation of scores in the three axes allowed a proper classification. In view the results, the fluorescence excitation emission matrices in combination with chemometric was shown to be a promising tool for the monitoring olive elaboration.

**Keyword** PARAFAC, Ascolana Ternera olives, lye olives, fermented olives, quality.

## Introducción

Italia es un país rico en elaboraciones tradicionales típicas de cada región y con recetas transmitidas de generación en generación. La composición química de estos productos apenas ha sido estudiada y puede constituir un valor añadido a los mismos.

Dentro de la gran variedad de productos, en la región de Marche, se cultiva una variedad de aceituna de alto calibre denominada, Ascolana Tenera, que en verde, es destinada a la elaboración de aceitunas de la Denominación de Origen Protegida “Oliva Tenera Ascolana del Piceno”. La elaboración puede ser al estilo natural o al estilo español tras un tratamiento con sosa y una fermentación. Después de ambas elaboraciones, se deshuesa y se rellena con carne triturada cocinada con vino blanco y sal y mezclada con cebolla y zanahoria. Posteriormente, la aceituna rellena, se reboza con harina, huevo y pan. De esta forma, el producto está listo para ser sometido a la fritura final (Lanza, 2012).

Unido a la alta sensibilidad de la variedad Ascolana Tenera en las etapas de cosecha y transporte en las que fácilmente se generan manchas negras, este tipo de elaboración es menos competitivo. Por otra parte, el disponer de herramientas que permitan un control en línea, rápido y sin necesidad de pretratamientos de las muestras supone un gran reto para la industria (Beyaz, Özkaya, & İçen, 2017; Fernández-Espinosa, 2016). Por todo ello, se pretende monitorizar la elaboración de las aceitunas Ascolana Tenera utilizando fluorescencia molecular bidimensional en la que se registran múltiples espectros de emisión, a diferentes longitudes de onda de excitación. Con el conjunto de muestras se forma un cubo de datos, cuyo posterior análisis se hace mediante algoritmos matemáticos como Análisis de Factores Paralelos (Parallel Factor Analysis, PARAFAC).

Se analizaron muestras de aceitunas en fresco, durante el proceso de cocido, tras los lavados, y durante y tras la fermentación.

## Materiales y métodos

Las aceitunas frescas de la variedad Ascolana Tenera se sometieron a dos elaboraciones. Un grupo de aceitunas se sumergió en una solución de sosa hasta que esta penetró dos tercios desde la epidermis de la aceitunas y fueron lavadas con agua mientras que el otro grupo se colocó en salmuera al 10% sin ser sometidas al cocido.

La matrices de excitación-emisión de la muestras de aceitunas se registraron en un rango de excitación de 260-295 nm y de emisión de 305-350 nm, ambos con una resolución de 5 nm. Para todas las medidas, las rendijas de excitación y emisión de los monocromadores se pusieron en 5 nm. El tubo fotomultiplicador se puso a 600 V y la velocidad de medida a 600 nm min<sup>-1</sup>.

## Resultados y discusión

Todas las muestras de Ascolana Tenera emitieron una alta señal de fluorescencia a 310 nm cuando las muestras se excitaron a 280 nm (Figura 1). La señal fluorescente de las muestras de aceitunas verdes naturales fue la más alta. Además hay que destacar que no se encontró fluorescencia entre la variedad ‘Ascolana tenera’ frescas y tras el tratamiento de cocido.

El modelo PARAFAC reveló que el primer componente de excitación presentó el máximo de excitación a 280 nm y el máximo de emisión fue a 315 nm. La alta fluorescencia de las muestras correspondió al primer componente en todas las muestras. El otro componente fluorescente fue no representativo y su información fue sólo usada para realizar la clasificación. Por lo tanto, el análisis de espectroscopía de fluorescencia combinado con quimiometría permite diferenciar exitosamente aceitunas elaboradas de diferentes estilos.

Para las clasificaciones, se utilizó un set de dos tipos de muestras. En el caso del Análisis por Factores Paralelos, se utilizaron tres componentes y uno de ellos se correlacionó con concentraciones cromatográficas de tirosol en un análisis previo de las aceitunas. La concentración de tirosol fue más alta en las aceitunas elaboradas al estilo natural (Figura 1). En este sentido, Pistarino et al. (2013) encontraron que este compuesto fenólico incrementó en las salmueras durante la fermentación debido a la hidrólisis de otros compuestos fenólicos (Ben Othman et al., 2009).

Cuando se analizaron por pares, representando los valores de los *scores* obtenidos por PARAFAC para los tres primeros componentes, se comprobó que los tres algoritmos utilizados: Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC), Análisis de Factores Paralelos-Análisis Lineal Discriminante (LDA-PARAFAC) y Análisis Discriminante-Desdoblado por Mínimos Cuadrados Parciales (DA-UPLS), permiten una buena diferenciación entre los grupos comparados (Figura 1). Por lo tanto el código predecido frente a los valores nominales reales de cada muestra en cada una de las categorías fueron exitosamente separados del resto de clases analizadas. En este sentido, el método propuesto es más simple y rápido que el utilizado mediante técnicas analíticas, por lo que el PARAFAC permite obtener una amplia información de los tipos distintos de elaboraciones y muestras analizadas (Figura 1).

### **Conclusión**

Por tanto, a la vista de los resultados, se abre la posibilidad de la utilización de la fluorescencia molecular en combinación con herramientas quimiométricas para la realización de un seguimiento del proceso de elaboración con el objetivo de estandarizar el proceso y calidad de las aceitunas de mesa elaboradas en diferentes estilos.

### **Agradecimientos**

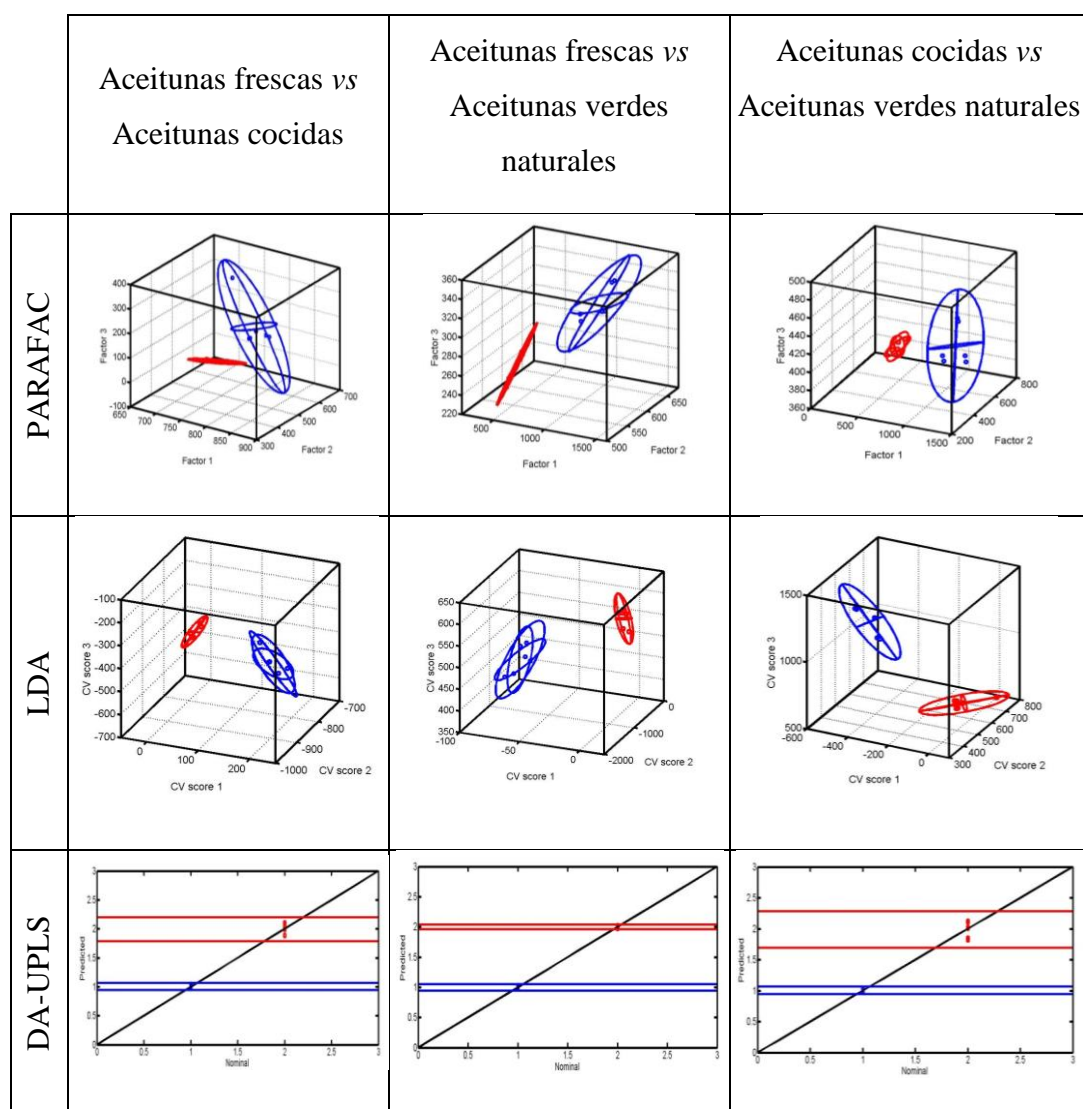
M. Cabrera-Bañegil agradece el patrocinio de la Comunidad Autónoma de Extremadura, de la Consejería de Economía e Infraestructuras y la cofinanciación del Fondo Social Europeo (FSE) por el contrato predoctoral (PD16015). I. Duran Merás are grateful to Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2017-82496-P) and the Junta de Extremadura (GR180541-Research Group FQM003, and Project IB16058), both co-financed by the European FEDER funds, for financially supporting this work.

### **Referencias**

- Ben Othman, N., Roblain, D., Chammem, N., Thonart, P., & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662-669.
- Beyaz, A., Özkaya, M.T., & İçen, D. 2017. Identification of some Spanish olive cultivars using image processing techniques. *Scientia Horticulturae* 225: 286-292.
- Fernández-Espinosa, A.J. 2016. Combining PLS regression with portable NIR spectroscopy to on-line monitor quality parameters in intact olives for determining optimal harvesting time. *Talanta* 148: 216-228.
- Lanza, B. 2012. Chapter 16. Nutritional and sensory quality of table olives. *The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy*: 343-372.
- Pistarino, E., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Paini, M., Cosulich, M.E., & Perego, P. 2013. Combined effect of starter culture and temperature on phenolic compounds during fermentation of Taggiasca black olives. *Food Chemistry*, 138, 2043-2049.



## Tablas y Figuras



**Figura 1-** Elipses de proyecciones tridimensionales al 95% de confianza de los scores proporcionados por PARAFAC, LDA-PARAFAC y DA-UPLS para el estado de elaboración de aceitunas frescas, cocidas y naturales.

## Contributo para a caracterização de azeitona de mesa de fermentação natural de Trás-os-Montes das cvs Negrinha de Freixo e Cobrançosa

Nuno Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Cristina Ramos<sup>2</sup>, Stéphanie Dischler<sup>1</sup>, Armando Ferreira<sup>2</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. nunorodrigues@ipb.pt

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) UTI - Unidade de Tecnologia e Inovação Av. da República s/n 2780-157 Oeiras, Portugal.

### Resumo

A azeitona de mesa é um produto obtido a partir de frutos são de algumas cultivares de oliveira. Tradicionalmente, na região de Trás-os-Montes, para o processamento de azeitona de mesa, eram usados frutos de diferentes cultivares, sendo a *cv.* Negrinha de Freixo a mais usada, e praticamente a única com processamento à escala industrial. No entanto, na última década, a utilização de frutos da *cv.* Cobrançosa tem vindo a ganhar expressão, representando já uma parte importante das azeitonas processadas na região. Este trabalho pretende fornecer um contributo para a caracterização morfológica, física, química, reológica, e sensorial de azeitonas de mesa processadas com ambas as cultivares. Foram selecionados, do mesmo produtor, dois lotes de azeitonas verdes de fermentação natural, um da *cv.* Negrinha de Freixo e outro da *cv.* Cobrançosa, nos quais se procedeu à determinação de parâmetros morfológicos do fruto e endocarpo; parâmetros físico-químicos da polpa (humidade, teor em gordura, cinzas, proteína) e valor energético; parâmetros reológicos da película (força, elasticidade, firmeza e energia para a rutura da película) e caracterização sensorial (de acordo com a Norma COI/OT/MO No1/Rev.2 November 2011). Os resultados indicam diferenças, nomeadamente ao nível dos parâmetros morfológicos e relação polpa/caroço (6,60 para a *cv.* Negrinha de Freixo e 4,63 para a *cv.* Cobrançosa). As azeitonas da *cv.* Cobrançosa são mais ricas em gordura (18,6%) e mais energéticas (222 kcal/100g) em comparação com as da *cv.* Negrinha de freixo (10,2 % de gordura e 132 kcal/100g). Com a exceção da firmeza, que foi superior na *cv.* Cobrançosa (3,230N/mm) em comparação com a *cv.* Negrinha de Freixo (2,521N/mm), todas as variáveis reológicas analisadas tiveram um valor superior na *cv.* Negrinha de Freixo. Do ponto de vista sensorial, as azeitonas da *cv.* Cobrançosa apresentaram maior dureza (6,1), maior fibrosidade (7,2) e maior crocância (5,4), comparativamente com as azeitonas da *cv.* Negrinha de Freixo.

**Palavras-chave:** caracterização morfológica, parâmetros nutricionais, características reológica, avaliação sensorial.

### Abstract

Table olives are a product obtained from the healthy fruits of some olive cultivars. Traditionally, in the region of Trás-os-Montes, fruits of different cultivars were used for the table olives processing, being *cv.* Negrinha de Freixo the most used, and practically the only one with industrial scale processing. However, in the last decade, the use of *cv.* Cobrançosa fruits has been gaining expression, already representing an important part of the olives processed in the region. This work aims to provide a contribution to the morphological, physical, chemical, rheological, and sensory characteristics of table olives processed with both cultivars. Two batches of naturally fermented green olives, one from

*cv.* Negrinha de Freixo and another from *cv.* Cobrançosa, in which the morphological parameters of the fruit and endocarp were determined; physical-chemical parameters of the pulp (moisture, fat content, ash, protein) and energy value; peel rheological parameters (strength, elasticity, firmness and energy to break the peel) and sensory characterization (according to Standard COI / OT / MO No1 / Rev.2 November 2011). The results indicate differences, namely in terms of morphological parameters and pulp/pit ratio (6.60 for *cv.* Negrinha de Freixo and 4.63 for *cv.* Cobrançosa). The olives of *cv.* Cobrançosa are richer in fat (18.6%) and more energetic (222 kcal / 100g) compared to those of *cv.* Negrinha de Freixo (10.2% fat and 132 kcal / 100g). With the exception of the firmness that was higher in *cv.* Cobrançosa (3.230N / mm) compared to *cv.* Negrinha de Freixo (2.521N / mm) all the rheological variables analyzed had a higher value in *cv.* Negrinha de Freixo. From the sensory point of view, the olives of *cv.* Cobrançosa presented greater hardness (6.1), greater fiber (7.2) and greater crispness (5.4) compared to olives from *cv.* Negrinha de Freixo.

**Keywords:** morphological characterization, nutritional parameters, rheological characteristics, sensory evaluation.

### **Introdução**

As azeitonas de mesa, produto obtido a partir de frutos são de algumas cultivares de oliveira, muito comuns na região do Mediterrâneo, fazem parte da dieta mediterrânica, sendo muito apreciadas e consumidas, pelas suas características sensoriais, químicas e nutricionais. Do ponto de vista nutricional, são consideradas um alimento muito rico. Para além da qualidade nutricional da sua gordura, maioritariamente monoinsaturada, possuem uma quantidade apreciável de antioxidantes naturais, destacando-se os compostos fenólicos (Malheiro et al., 2014), os tocoferóis (Sakouhi et al., 2008) e algumas vitaminas e minerais (Fernández-Poyatos et al., 2019).

De entre as cultivares de oliveira conhecidas, nem todas apresentam aptidão para serem processadas como azeitona de mesa. Assim, as cultivares que foram selecionadas para azeitona de mesa, de uma maneira geral, apresentam características visuais atrativas, uma boa relação polpa/carço, baixos teores em gordura e polpa firme, para que suportem o processo tecnológico a que os frutos são submetidos para os tornar edíveis. Por outro lado, são também valorizadas cultivares que conferem determinadas características sensoriais apreciadas pelos consumidores.

Em Trás-os-Montes, a produção de azeitonas de mesa tem uma grande tradição (Sousa et al., 2011), fazendo este alimento parte da gastronomia regional, e embora, para o processamento de azeitona de mesa, sejam utilizados frutos de diferentes cultivares, destaca-se a *cv.* Negrinha de Freixo como a mais usada. No entanto, na última década, os frutos da *cv.* Cobrançosa têm vindo a ganhar expressão, representando já uma parte importante das azeitonas processadas na região.

Este trabalho pretende fornecer um contributo para a caracterização morfológica, física, química, reológica e sensorial de azeitonas de mesa de fermentação natural, processadas a partir das cultivares Negrinha de Freixo e Cobrançosa.

### **Material e métodos**

Foram selecionados, dois lotes de azeitonas verdes de fermentação natural, um da *cv.* Negrinha de Freixo e outro da *cv.* Cobrançosa, que foram processadas em condições semelhantes pelo mesmo produtor. De cada lote foram recolhidas três amostras de 1kg, as quais foram avaliadas quanto a parâmetros:

- Biométricos: comprimento do fruto (mm); diâmetro máximo do fruto (mm); peso (g); classificação do peso; forma C/L; classificação da forma; posição do diâmetro transversal máximo (posição) (n=40), de acordo com as características UPOV (UPOV, 2011).
- Químicos: teores em humidade (expresso em %, seguindo o método AOAC 925.40 de 1995); gordura (expresso em %, de acordo com o método AOAC 948.22 de 2000) cinzas (expresso em %, segundo o método AOAC 940.26 de 2000), proteína (de acordo com o procedimento AOAC 920.152 (2000), expresso em %); hidratos de carbono (determinação pela subtração do teor em humidade, cinzas, proteína e gordura, expresso em %), valor energético (expresso em Kcal/100g).
- Reológicos: textura – ensaios de punção em Analyser TA-Hdi, (Stable Micro System, UK), com sonda de 2 mm, célula de carga de 5Kg, velocidade de 1mm.s<sup>-1</sup> e distância 4 mm, determinando-se a força máxima, expressa em N, a partir da curva de força-deformação, dureza – força máxima em N, distância à rotura em mm e firmeza em N/mm.
- Sensoriais: a análise sensorial foi realizada através de um painel de provadores, constituído por elementos treinados, que avaliaram atributos de acordo com a Norma COI/OT/MO No1/Rev.2 November 2011.

### Resultados e discussão

Os resultados indicam que relativamente aos parâmetros morfológicos (Tabela 1), os frutos de ambas as cultivares evidenciam diferenças nos parâmetros avaliados. Assim, diferenciação sobretudo no que respeita: à forma, com os frutos da *cv. Negrinha de Freixo* a serem mais redondos; à massa do endocarpo, com a *cv. Cobrançosa* a ter endocarpos mais pesados; e na relação polpa/caroço com valores muito mais favoráveis, de 6,60, para a *cv. Negrinha de Freixo* em comparação com o valor de 4,63 para a *cv. Cobrançosa*. Este aspeto justifica, em parte, a tradição do uso dos frutos da *cv. Negrinha de Freixo* para a preparação de azeitona de mesa, uma vez que para além de serem frutos redondos e muito atrativos visualmente, apresentam um endocarpo pequeno e uma elevada quantidade de polpa por fruto.

Quanto à composição química (fig. 1), as azeitonas da *cv. Cobrançosa* são mais ricas em gordura (18,6%) e consequentemente mais energéticas, com 222 kcal/100g de parte edível, do que as da *cv. Negrinha de Freixo* que apresentam um teor de gordura de 10,2 % e um valor energético de 132 kcal/100g de parte edível. Este trabalho não teve por objetivo proceder à caracterização da gordura de ambas as cultivares, mas dados recentes indicam que, o teor em ácidos gordos monoinsaturados é cerca de 3% superior na *Negrinha de Freixo* do que na *cv. Cobrançosa*, enquanto o teor em polinsaturados é cerca de metade na *Negrinha de Freixo* em comparação com a *cv. Cobrançosa* (Malheiro et al., 2012).

No que se refere aos parâmetros reológicos, com a exceção da firmeza, que foi superior na *cv. Cobrançosa* (3,230 N/mm) em comparação com a *cv. Negrinha de Freixo* (2,521N/mm), todas as variáveis reológicas determinadas apresentaram valores superiores para a *cv. Negrinha de Freixo* (fig. 2).

Do ponto de vista sensorial (fig. 3), verificaram-se grandes diferenças nas cultivares estudadas, não tendo sido detetado qualquer defeito sensorial. Na avaliação das sensações cinestésicas, numa escala não estruturada de 1-11 cm, a *cv. Cobrançosa* apresentou maior dureza (6,1), maior fibrosidade (7,2) e maior crocância (5,4), comparativamente com as azeitonas da *cv. Negrinha de Freixo*.

## Conclusão

Os resultados obtidos são um contributo para a caracterização das azeitonas verdes de fermentação natural das cvs. Cobrançosa e Negrinha de Freixo. Constatou-se que do ponto de vista físico-químico, reológico e sensorial, estas azeitonas são substancialmente diferentes. Observou-se também que apesar da cv. Negrinha de Freixo ser tradicionalmente usada para azeitona de mesa, a cv. Cobrançosa apresenta também boas características adequadas para serem processadas tecnologicamente como azeitona de mesa.

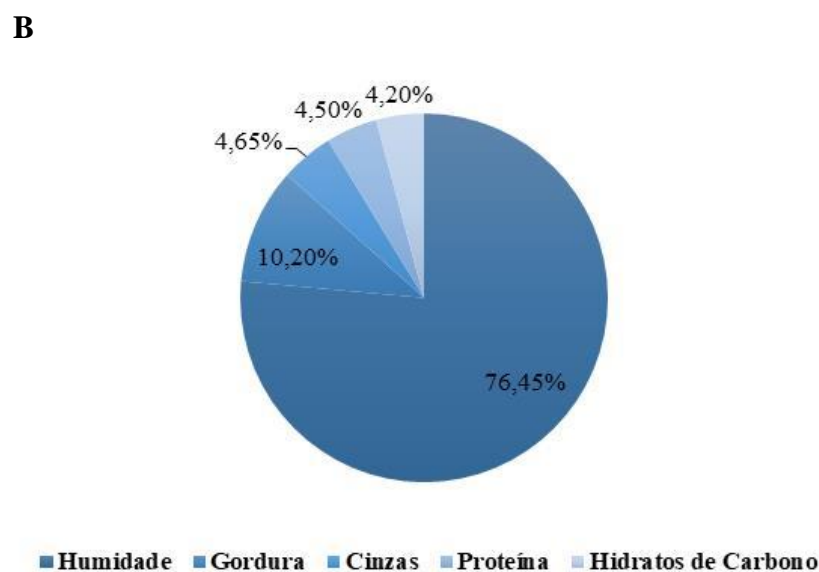
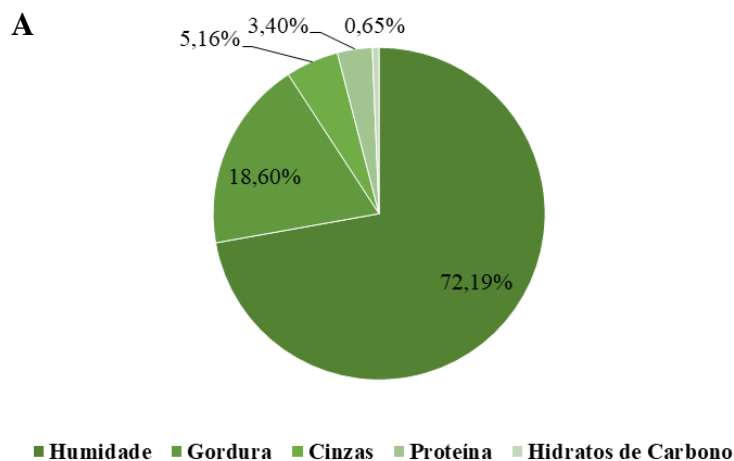
## Referências

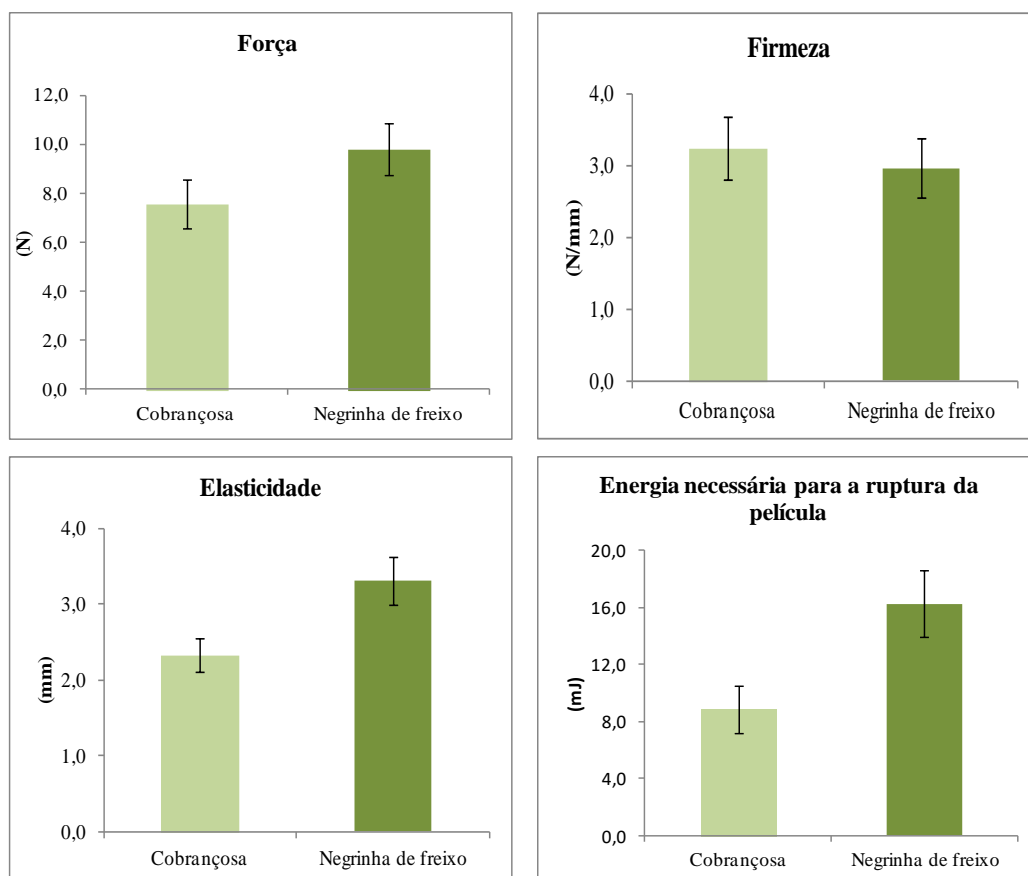
- AOAC (1995), Official Methods of Analysis, 16th Ed, Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- AOAC (2000), Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Ed.; Horwitz, W.; AOAC: Arlington, VA, Vol, II (1-3).
- AOAC (2012), Official Method 948.22. Fat (crude) in nuts and nut products. Gravimetric methods, in: *Official Methods of Analysis of AOAC Internacional*, 19<sup>th</sup> ed, AOAC Internacional, Gaithersburg, MD, USA, 2012.
- COI, 2011. Conselho Oleícola Internacional, Method for the sensory analysis of table olives, COI/OT/MO No1/Rev.2 November 2011. Acedido em 20 novembro de 2019. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods>.
- Fernández-Poyatos, M.P., Ruiz-Medina, A. & Llorent-Martínez, E.J. 2019. Phytochemical profile, mineral content, and antioxidant activity of *Olea europaea* L. cv. Cornezuelo table olives. Influence of in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 297, 124933.
- Malheiro, R., Casal, S., Sousa, A., Pinho, P.G., Peres, A.M., Dias, L.G., Bento, A. & Pereira, J.A. 2011. Effect of Cultivar on Sensory Characteristics, Chemical Composition, and Nutritional Value of Stoned Green Table Olives. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1733-1742.
- Malheiro, R., Mendes, P., Fernandes, F., Rodrigues, N., Bento, A. & Pereira, J.A. 2014. Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food and Function*, 5, 3132-3142.
- Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K. & Boukhchina Kallel, H. 2008.  $\alpha$ -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.
- 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.
- UPOV-Internacional Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Enlarged Editorial Committee at its meeting to be held in Geneva, Switzerland, on January 6, 2011.

## Tabelas e Figuras

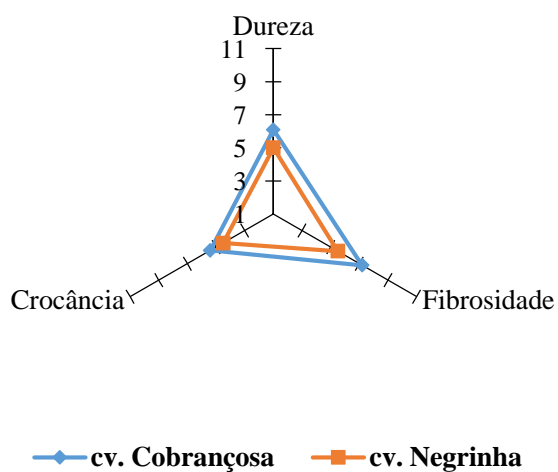
**Tabela 1** – Variáveis quantitativas dos frutos das 2 cultivares (média  $\pm$  desvio padrão, n=40)

Cultivar		Comprimento (mm)	Diâmetro máximo (mm)	Massa (g)	Forma (C/L)	Relação polpa/caroço
cv. Negrinha de Freixo	Fruto	21,24 $\pm$ 0,65	16,47 $\pm$ 0,60	3,65 $\pm$ 0,44	1,29 $\pm$ 0,04	6,60
	Endocarpo	14,88 $\pm$ 0,99	7,63 $\pm$ 0,42	0,56 $\pm$ 0,08	1,95 $\pm$ 0,11	
cv. Cobrançosa	Fruto	22,28 $\pm$ 0,95	15,90 $\pm$ 0,52	3,67 $\pm$ 0,34	1,40 $\pm$ 0,06	4,63
	Endocarpo	17,09 $\pm$ 0,92	8,42 $\pm$ 0,44	0,80 $\pm$ 0,08	2,03 $\pm$ 0,12	

**Figura 1** – Composição química, por 100 gramas de polpa, das azeitonas de mesa verdes de fermentação natural das cvs. Cobrançosa (A) e Negrinha de Freixo (B)



**Figura 2** – Parâmetros reológicos de azeitonas de mesa verdes de fermentação natural das cvs. Cobrançosa e Negrinha de Freixo.



**Figura 3** – Avaliação sensorial (sensações cinestésicas) de azeitonas de mesa verdes de fermentação natural das cvs. Cobrançosa e Negrinha de Freixo.

## **Produção de Farinha de Polpa de Azeitona de Conserva “Negrinha de Freixo”**

Rogério Antunes<sup>1</sup>, Nuno Rodrigues<sup>1</sup>, Cristiane Silva<sup>2</sup>, Amanda B. Maciel<sup>3</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup> & Elsa Ramalhosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal, rogerio\_c.antunes@hotmail.com, nunorodrigues@ipb.pt, jpereira@ipb.pt, elsa@ipb.pt;

<sup>2</sup>Instituto Federal Fluminense - Campus Bom Jesus do Itabapoana, Bom Jesus do Itabapoana, Brasil, kristtiane2015@gmail.com;

<sup>3</sup>Instituto Federal da Rondônia - Campus Colorado do Oeste, Colorado do Oeste, Brasil, amanda.maciel295@gmail.com;

### **Resumo**

Em Portugal, existe grande tradição na produção de azeitona de mesa, sendo Trás-os-Montes uma das principais regiões produtoras. No País estão reconhecidas duas Denominações de Origem Protegida (DOP) para azeitona de mesa, uma das quais situada a norte de Portugal designada “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”. De modo a valorizar esta azeitona de mesa e promover a diversidade e inovação de produtos feitos à base deste fruto, o presente trabalho teve como objetivo principal a produção de farinha de polpa de “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” para ser utilizada em preparações de alta cozinha.

Foram utilizadas azeitona de conserva de fermentação natural da cv. Negrinha de Freixo, que após descaroçadas, foram colocadas em monocamada a secar ao longo de diferentes tempos, tendo sido avaliadas a aparência e a cor, e determinados os teores em água ( $W$ , g água/g matéria seca) e a atividade da água ao longo da secagem. Aplicaram-se três tipos de secagem distintos: (i) ventilação forçada com ar quente a 50 °C; (ii) vácuo a 50 °C; e (iii) liofilização. Aplicaram-se dois modelos de secagem, designadamente, os modelos de Lewis e Page, modelos muito aplicados na secagem de alimentos.

Verificou-se que o método que originou o produto final com melhores características físicas (cor e aparência) foi a liofilização. Ambos os modelos se ajustaram adequadamente aos dados experimentais, com coeficientes de determinação ajustados ( $R^2$  ajustado) superiores a 0,92. Contudo, para o modelo de Page foram obtidos  $R^2$  ajustados superiores aos determinados pelo modelo de Lewis (0,958-0,988 *versus* 0,924-0,981, respetivamente), indicando ser o mais adequado para modelar a cinética de secagem da azeitona cv. Negrinha de Freixo.

**Palavras-chave:** secagem; ar quente; vácuo; liofilização; modelação.

### **Abstract**

In Portugal, there is great tradition in table olives production, being Trás-os-Montes one of the main producing regions. In this country, two Protected Designations of Origin (PDO) for table olives are recognized, one of them located in the north of Portugal, called “Negrinha de Freixo Table Olive”. In order to valorize this table olive and to promote the diversity and innovation of products based on this fruit, the main objective of this work was to produce flour from cv. “Negrinha de Freixo” table olive to be used in gourmet preparations.



Table olives (cv. “Negrinha de Freixo”) from natural fermentation were dried by different processes. The appearance, color, moisture contents ( $W$ , g water / g dry matter) and water activity were determined throughout the drying process. Three different types of drying were applied: (i) forced ventilation with hot air at 50 °C; (ii) vacuum at 50 °C; and (iii) freeze drying. Two drying models, namely Lewis and Page models were applied, being these models normally used in food drying processes.

The method that gave the final product with better physical characteristics (color and appearance) was freeze drying. Both models fitted well to the experimental data, with adjusted coefficients of determination ( $\text{Adj-R}^2$ ) higher than 0.92. However, for Page model, the  $\text{Adj-R}^2$  was higher than that determined by Lewis model (0.958-0.988 *versus* 0.924-0.981, respectively), indicating to be the most suitable for modeling the drying kinetics of the cv. Negrinha de Freixo table olives.

**Keywords:** drying; hot air; vacuum; freeze-drying; modeling.

### Introdução

As azeitonas de mesa são um alimento presente na dieta mediterrânea, sendo muito consumidas no mundo. São uma fonte importante em compostos fenólicos e ricas em gorduras monoinsaturadas, contribuindo a sua ingestão para a diminuição de doenças cardiovasculares.

Trás-os-Montes é a principal região produtora portuguesa, sendo reconhecida nesta região a Denominação de Origem Protegida (DOP) “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo” que tem por base a utilização de frutos da variedade Negrinha de Freixo. O registo deste produto como DOP está indicado no Regulamento (CE) N.º 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996, encontrando-se o caderno de especificações descrito no documento intitulado “Anexo I - “Principais características da “Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo”” do Ministério da Agricultura (s/d).

A secagem de azeitonas não é um método muito vulgarizado. Contudo, são conhecidos alguns estudos, como por exemplo, da azeitona verde de mesa da cultivar Domat (Ongen *et al.*, 2005; Demir *et al.*, 2007), e da azeitona da cultivar Cassanese processada pelo método “Ferrandina” (Marsilio *et al.*, 2000).

O objetivo deste estudo, foi elaborar uma farinha de polpa de azeitona de mesa da variedade Negrinha de Freixo, contribuindo desta forma para a valorização de um produto tão nobre de Trás-os-Montes, possibilitando a sua incorporação em pratos gourmet ou noutro tipo de produtos. Para melhor compreender o processo de secagem deste fruto, procedeu-se também ao estudo da cinética de secagem de azeitonas de mesa processadas com a Cv. Negrinha de Freixo, por secagem por ar quente, vácuo e liofilização.

### Materiais e métodos

#### A) Amostras

Foram adquiridas amostras comerciais de azeitona de conserva da variedade Negrinha de Freixo.

#### B) Processos de secagem

Prepararam-se 140 placas de Petri com 4 azeitonas (previamente lavadas com água destilada e descaroadas), pesadas anteriormente. As placas com as azeitonas foram sujeitas aos seguintes tipos de secagem: ventilação por ar forçado (Memmert) a 50 °C, vácuo [Lab-line (3618P-1)] a 50 °C e liofilização (Scanvac - cool safe 110-4). A cada tempo de secagem foram retiradas 5 placas de Petri, as quais foram colocadas num

exsicador. Posteriormente, as azeitonas foram novamente pesadas e determinados os valores de atividade da água.

Para proceder à modelação da cinética de secagem, determinaram-se os seguintes parâmetros:

$$W \text{ (g água/g matéria seca)} = \frac{m(\text{azeitona após secagem}) - m(\text{matéria seca})}{m(\text{matéria seca})}$$

$$MR = [(W - W_e)/(W_0 - W_e)], \text{ sendo } W_e = W \text{ de equilíbrio e } W_0 = W(t=0).$$

Dois modelos de secagem foram avaliados, designadamente:

$$\text{Lewis (} MR = e^{-K \times t} \text{)}$$

$$\text{Page (} MR = e^{-K \times t^n} \text{)}$$

A qualidade dos ajustes foi avaliada pela determinação dos seguintes parâmetros: SSE, RMSE,  $R^2$  e  $R^2$  ajustado, calculados pelas seguintes formulas:

$$SSE = \sum_{i=1}^n (MR_{exp,i} - MR_{pre,i})^2$$

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \text{ com } SST = \sum_{i=1}^n (MR_{exp,i} - MR_{médio})^2$$

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{SSE \times (n-1)}{SST \times \vartheta} \text{ com } \vartheta = n-m$$

$$RMSE = \sqrt{MSE} \text{ com } MSE = \frac{SSE}{\vartheta}$$

$$MR_{exp} = MR_{experimental}$$

$$MR_{pre} = MR_{previsto}$$

n = número de observações

m = número de parâmetros de cada modelo

## Resultados e discussão

As curvas de secagem encontram-se representadas na Figura 1, tendo-se observado que, no início do processo (até aproximadamente 5 horas), a ventilação por ar quente foi o método que acarretou uma maior descida nos valores de  $W$ . Pelo contrário, o processo que originou a descida mais rápida nos valores de  $W$ , após aproximadamente 7 horas de secagem, foi a liofilização. Contudo, após 24 horas de desidratação, os valores de  $W$  obtidos para os três processos foram idênticos (entre 0,2 a 0,3 g água/ g matéria seca). Ao comparar os valores de  $W$  ao longo do tempo obtidos no presente trabalho com os indicados por Öngen *et al.* (2005) durante o processo de secagem de azeitonas da variedade Domat (Turquia), estes autores observaram um decréscimo mais rápido nos valores de  $W$ , atingindo valores próximos de 0,2 g água/ g matéria seca após 5 horas de secagem. No entanto, deve ser referido que os frutos utilizados por estes autores apresentavam no início valores de  $W$  inferiores (aproximadamente 0,7 g água/ g matéria seca) do que os observados no presente trabalho.

De facto, antes do processo de secagem, as azeitonas tinham sofrido um tratamento com hidróxido de sódio, uma fermentação e sido colocadas numa solução de ácido láctico a 0,4% durante 48 horas para reduzir a concentração em sal e a acidez (Öngen *et al.*, 2005), explicando os menores valores observados de  $W$  no início da secagem. A qualidade dos ajustes dos modelos de Page e Lewis está descrita no Quadro 1. Os modelos testados encontram-se representados na Figura 2. O modelo de Page foi aquele que melhor se ajustou aos dados experimentais, com maiores valores de  $R^2$  e  $R^2$  ajustado e menores valores de SSE e RMSE. Os valores de  $R^2$  e  $R^2$  ajustado foram superiores a 0,92, tendo os valores de SSE sido inferiores a 0,08 e de RMSE menores do que 0,09 (Quadro 1). Deve ser referido que ambos os modelos (Page e Lewis) apresentam

um coeficiente de secagem ( $K$ , tempo<sup>-1</sup>), apresentando o modelo de Page um expoente de secagem, não existente no modelo de Lewis, o que permitirá obter um melhor ajuste aos dados experimentais.

Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes aos obtidos por Demir *et al.* (2007) que aplicaram os modelos de Page, Logarítmico, Midilli *et al.* e um novo modelo por eles desenvolvido [ $MR = a \times e^{(-K \times t)^n} + b$ ], ao processo de secagem de azeitonas verdes da variedade Domat (Turquia), indicando que todos os modelos se ajustavam de forma adequada aos dados experimentais (50 °C,  $R^2 > 0,99$ ), tendo sido o modelo por eles desenvolvido aquele que tinha fornecido os melhores resultados. Assim, no futuro pretende-se aplicar mais modelos aos dados experimentais obtidos no presente trabalho.

Para todos os métodos de secagem, observou-se que os valores de atividade de água das farinhas obtidas foram inferiores a 0,6, sendo que na secagem por ventilação durante 48 horas o valor de  $a_w$  foi de 0,330, na secagem por vácuo durante 96 horas foi de 0,368 e por liofilização durante 24 horas foi de 0,536, conferindo estabilidade aos produtos obtidos.

### Conclusões

O presente trabalho permitiu concluir que o método de secagem que originou o produto final com melhores características físicas (cor e aparência) foi a liofilização. Os modelos de Page e Lewis ajustaram-se adequadamente aos dados experimentais, com  $R^2$  ajustados superiores a 0,92. Contudo, para o modelo de Page foram obtidos  $R^2$  ajustados superiores aos determinados pelo modelo de Lewis, indicando ser o mais adequado para modelar a cinética de secagem da azeitona cv. Negrinha de Freixo.

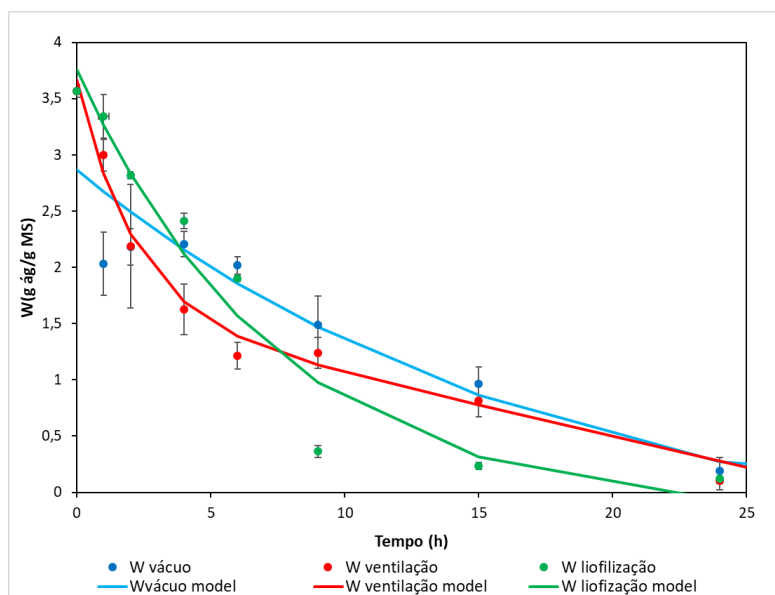
### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020) através de fundos nacionais FCT/MCTES e no âmbito da celebração do contrato-programa de emprego científico com Nuno Rodrigues.

### Referências

- Ongen, G., Sargim, S., Tetik D. & Kose, T., 2005. Drying of Green Table Olives. *Food Technology and Biotechnology*. **43**: 181–187.
- Demir, V., Gunhan, T. & Yagcioglu, A.K., 2007. Mathematical modelling of convection drying of green table olives, *Biosystems Engineering*. **98**: 47-53.
- Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C. & Angelis, M., 2000. Oven-dried table olives: textural properties as related to pectic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**:1271-1276.
- Ministério da Agricultura (s/d). ANEXO I - Principais características da "Azeitona de Conserva Negrinha de Freixo "
- ([https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod\\_imagens/azeites/docs/doc\\_azeitona\\_conserva\\_negrinha\\_freixo.pdf](https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod_imagens/azeites/docs/doc_azeitona_conserva_negrinha_freixo.pdf))
- Regulamento (CE) N.º 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996 relativo ao registo das indicações geográficas e denominações de origem nos termos do procedimento previsto no artigo 17.º do Regulamento (CEE) n.º 2081/92 do Conselho. Jornal Oficial das Comunidades Europeias N.º L 148/1 de 21/6/96.

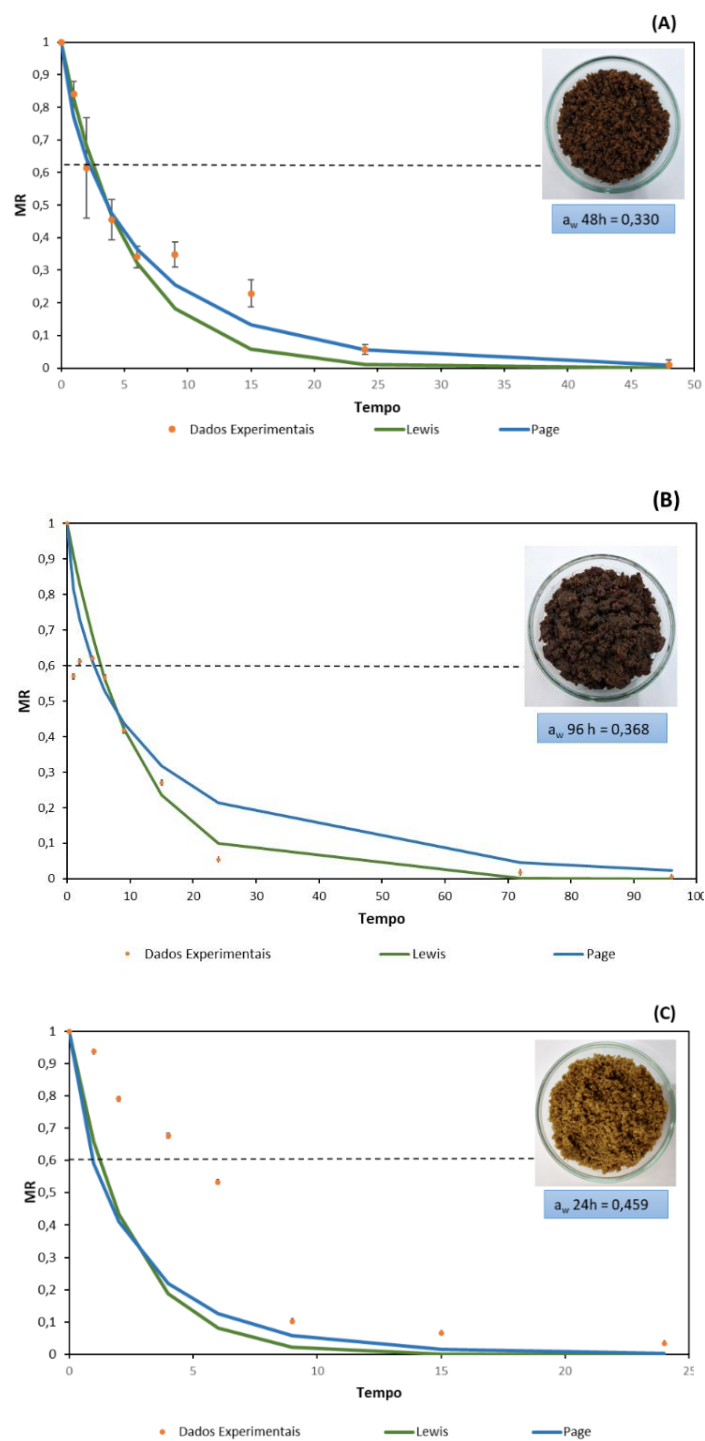
## Quadros e Figuras



**Figura 1** -  $W$  versus tempo para os três tipos de secagem.

**Quadro 4-** Qualidade dos ajustes obtidos para os Modelos de Lewis e Page.

	Modelo	SSE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
<b>Vácuo</b>	Lewis	0,07969	0,0941	0,924	0,924
	Page	0,03928	0,0700	0,962	0,958
<b>Ventilação</b>	Lewis	0,01849	0,0481	0,981	0,981
	Page	0,01061	0,0389	0,989	0,987
<b>Liofilização</b>	Lewis	0,01838	0,0512	0,979	0,979
	Page	0,00858	0,0378	0,990	0,988



**Figura 2** - Valores de MR versus tempo: Ventilação forçada com ar quente (50°C) (A), Vácuo a 50°C (B) e Liofilização (C).

## **Caracterização físico-química de farinhas de azeitona produzidas por diferentes métodos de secagem**

Rogério Antunes<sup>1</sup>, Nuno Rodrigues<sup>1</sup>, Cristiane Silva<sup>2</sup>, Amanda B. Maciel<sup>3</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup> & Elsa Ramalhosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal, rogerio\_c.antunes@hotmail.com, nunorodrigues@ipb.pt, jpereira@ipb.pt, elsa@ipb.pt;

<sup>2</sup>Instituto Federal Fluminense - Campus Bom Jesus do Itabapoana, Bom Jesus do Itabapoana, Brasil, kristtiane2015@gmail.com;

<sup>3</sup>Instituto Federal da Rondônia - Campus Colorado do Oeste, Colorado do Oeste, Brasil, amanda.maciel295@gmail.com;

### **Resumo**

No presente trabalho pretendeu-se caracterizar em termos físico-químicos farinhas de azeitona da variedade Negrinha de Freixo, produzidas pela aplicação de diferentes métodos de secagem antes da moenda. Num primeiro ensaio procedeu-se à caracterização das azeitonas a ser submetidas à secagem, apresentando os frutos uma massa de 5,53 g, uma altura de 23 mm, diâmetro de 19 mm, atividade da água ( $a_w$ ) de 0,987, um valor de pH de 4,64 e um teor de gordura de 69,13% (m.s.), em valores médios.

Num segundo ensaio procedeu-se à secagem destas azeitonas por liofilização (24 horas), ventilação com ar quente (24 e 48 horas) e vácuo (96 horas), de modo a obter-se posteriormente diferentes farinhas após moenda dos frutos desidratados. As condições operacionais utilizadas foram definidas após realização de ensaios de secagem prévios. Todas as farinhas obtidas no presente trabalho apresentaram valores de  $a_w$  inferiores a 0,7, tendo sido os menores valores (<0,4) observados com a ventilação com ar quente durante 48 horas e vácuo (96 horas). Contudo, o processo de liofilização foi aquele que menos alterou a cor, apresentando a farinha uma  $a_w$  de 0,536.

Num terceiro ensaio procedeu-se à demolha das azeitonas durante 3 e 5 dias antes de se proceder à liofilização (24 h), uma vez que este processo de desidratação foi aquele que originou posteriormente uma farinha com o melhor aspeto visual em relação à cor. A imersão das azeitonas em água durante 3 e 5 dias provocou uma diminuição no teor de cinzas de 21,5 e 35,6%, respetivamente, em relação à situação sem demolha, em resultado da difusão do sal. Pelo contrário, o teor de gordura não foi alterado significativamente.

De referir que as farinhas obtidas nestes ensaios apresentaram valores de  $a_w$  inferiores a 0,6, conferindo-lhes estabilidade microbiológica.

**Palavras-chave:** Liofilização; Ar quente; Vácuo; Negrinha de Freixo; Demolha.

### **Abstract**

In the present work we intend to characterize, physically and chemically, table olives flours of Negrinha de Freixo variety, produced by the application of different drying methods before milling. In a first experiment, the olives to be subjected to drying were characterized. The fruits had a mass of 5.53 g, height of 23 mm, diameter of 19 mm, water activity ( $a_w$ ) of 0.987, a pH value of 4.64 and a fat content of 69.13% (d.w.), on average.

In a second experiment, these olives were dried by freeze-drying (24 hours), hot air convective (24 and 48 hours) and vacuum (96 hours) drying before milling, in order

to obtain different flours. The operating conditions used were defined on previous drying tests. All flours obtained in the present study had values of  $a_w$  lower than 0.7, and the lowest values ( $<0.4$ ) were observed with hot air convective drying for 48 hours and vacuum (96 hours). However, the freeze-drying process was the one that less altered the color, with the flour having an  $a_w$  of 0.536.

In a third experiment the olives were soaked for 3 and 5 days prior to freeze-drying (24 h), as this process was the one which gave a flour with the best visual appearance in relation to color. Immersion of the olives into water for 3 and 5 days resulted in a decrease in the ash content of 21.5 and 35.6%, respectively, relative to the control condition (unsoaked), due to salt diffusion. On contrary, the fat content was not significantly altered.

It should be noted that the flours obtained in these tests presented  $a_w$  values less than 0.6, giving them microbiological stability.

**Keywords:** Freeze-drying; Hot air; Vacuum; Negrinha de Freixo; Water Soaking.

### **Introdução**

Existem vários trabalhos que abordam a secagem de vários frutos, inclusive, trabalhos de secagem de azeitona. No entanto, todos estes trabalhos abordam o tema da cinética de secagem, não tendo sido realizados estudos em relação às farinhas obtidas. Ongen et al. (2005), por exemplo, realizaram estudos de secagem em azeitona de mesa verdes, estudando a cinética de secagem, a qualidade das azeitonas obtidas e a aceitação do consumidor. Marsilio et al. (2000) também realizaram estudos de secagem de azeitona, incluindo três etapas: uma primeira etapa de aquecimento, uma etapa de salga e um processo de secagem no forno, de modo a se verificar os efeitos deste processamento ao nível da estrutura microscópica, frações pécticas e a textura.

Assim sendo, o objetivo principal do nosso trabalho foi aplicar diferentes métodos de secagem antes de se proceder à moenda, e caracterizar as farinhas obtidas, estudando-se também o efeito de se proceder a uma demolha prévia dos frutos, a tempos diferentes, para melhorar a qualidade organolética do produto obtido.

### **Materiais e métodos**

#### **A) Amostras**

Para realizar os ensaios, foram utilizadas amostras comerciais de azeitona da variedade Negrinha de Freixo. Previamente, procedeu-se à caracterização destas azeitonas, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros a 25 frutos: massa, altura e diâmetro. Também se determinaram a  $a_w$ , pH e teor de gordura.

#### **B) Processos de Secagem**

Para cada tipo de secagem, prepararam-se cinco placas de Petri, com quatro azeitonas comerciais previamente lavadas com água destilada e descaroadas com o auxílio de um martelo para serem sujeitas a um dos seguintes tratamentos: liofilização durante 24 horas (Scanvac - cool safe 110-4), ventilação com ar quente durante 24 e 48 horas (Memmert) e vácuo durante 96 horas (Lab-line (3618P-1)). Após secagem, os frutos desidratados foram moídos num moinho universal (IKA -Werke M20) para se obterem as farinhas.

#### **C) Demolha e Secagem**

Neste ensaio fez-se a demolha das azeitonas comerciais, de 3 ou 5 dias com água da companhia, mudando a água diariamente, numa proporção de 400 g de amostra e 800 mL de água. Colocaram-se as amostras sem demolha, com demolha de 3 e 5 dias, em monocamada, descaroadas, num tabuleiro no liofilizador. Após 24 horas, as amostras

foram retiradas para o exsiccador e trituradas num moinho universal (IKA -Werke M20) para se obterem as farinhas.

D) Análises físico-químicas realizadas às farinhas obtidas

Determinaram-se os valores de  $a_w$  (Labswift-aw), cor utilizando o colorímetro (Chroma Meter CR-400), teor de cinzas na mufla (525 °C) (Lenton Thermal Designs LTD) e o teor de gordura por extração em Soxhlet com éter de petróleo durante 24 horas. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

## Resultados e Discussão

A variedade Negrinha de Freixo apresentou, em termos médios, uma massa de 5,53 g, altura de 23,11 mm, e diâmetro de 19 mm. Relativamente à cor, obtiveram-se valores de  $L^*$  de 53,46,  $a^*$  de 1,00,  $b^*$  de 32,73,  $C^*$  de 33,08 e  $h$  de 88,23 (Quadro 1).

Verificou-se que a atividade de água da amostra fresca foi de 0,987, o pH de 4,64 e o teor de gordura de 17,28% (m.h.) e 69,13% (m.s.).

Relativamente aos ensaios de secagem (Quadro 2), na liofilização de 24 horas a farinha obtida apresentou uma atividade de água de 0,536. Já a farinha obtida por ventilação durante 48 horas apresentou um valor de 0,330. Por fim, a secagem por vácuo durante 96 horas, originou um valor de 0,368. Assim sendo, todos os valores foram inferiores a 0,5 apresentando uma grande descida em relação ao fruto fresco como era expectável. Os teores de gordura não apresentaram diferenças significativas em relação à amostra fresca, apresentando valores muito próximos entre si (Quadro 2).

Em relação à cor verificou-se que, dentro dos diferentes tipos de secagem, a ventilação com ar quente e vácuo foram os métodos que apresentaram valores muito próximos entre si e bastante diferentes em relação à liofilização, sendo este o método de secagem que originou uma farinha com valores mais próximos da amostra fresca, tendo um valor de  $L^*$  de 47,96,  $a^*$  de 6,70 e  $b^*$  de 21,55, valores semelhantes aos determinados na amostra fresca (valor de  $L^*$  de 53,46,  $a^*$  1,00 e  $b^*$  32,73). Desta forma, podemos verificar que as farinhas obtidas após secagem por vácuo e ventilação com ar quente apresentaram uma menor luminosidade (farinhas mais escuras) do que a amostra fresca e a farinha obtida por liofilização.

Relativamente aos valores de  $a^*$ , estes foram próximos entre os métodos de secagem. Pelo contrário, em relação ao valor de  $b^*$ , os maiores valores foram obtidos com a liofilização, tendo os menores resultados sido obtidos com a convecção por ar quente e vácuo. Assim, a liofilização foi o método que forneceu farinhas com uma cor mais amarela. Além disso, podemos verificar que as amostras liofilizadas, foram as mais próximas da amostra fresca, em relação à cor com valores verde-amarelado. Deste modo, verificou-se que o melhor método de secagem foi a liofilização, tendo sido o processo que menos alteração de cor provocou nos frutos face à amostra fresca, originando um produto com uma atividade de água com valores inferiores a 0,6, o que lhe confere estabilidade microbiológica significativa.

Salvo algumas exceções, na liofilização sem demolha e com demolha de 3 e 5 dias, verificou-se grande proximidade nos valores da cor, da atividade da água e do teor de gordura. Pelo contrário, observaram-se diferenças significativas no teor de cinzas, sendo que, ao aumentar o tempo de demolha, o teor de cinzas diminuiu gradualmente, pela perda de sais (difusão do NaCl), visto que o objetivo da demolha era diminuir o teor em sal na amostra (Quadro 3). Em mais pormenor, a imersão das azeitonas em água durante 3 e 5 dias provocou uma diminuição no teor de cinzas de 21,5 e 35,6%, respetivamente, em relação à situação sem demolha.



## Conclusões

Em suma, o presente trabalho permitiu a produção de um produto alimentar inovador, que poderá ser utilizado com diferentes finalidades, como por exemplo serem incorporados em produtos de padaria e molhos, através de processos de secagem distintos. Contudo, a liofilização foi o método que menos alterou a cor. Além disso, a demolha de 3 a 5 dias acarretou uma diminuição de cinzas superior a 20%.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020) através de fundos nacionais FCT/MCTES e no âmbito da celebração do contrato-programa de emprego científico com Nuno Rodrigues.

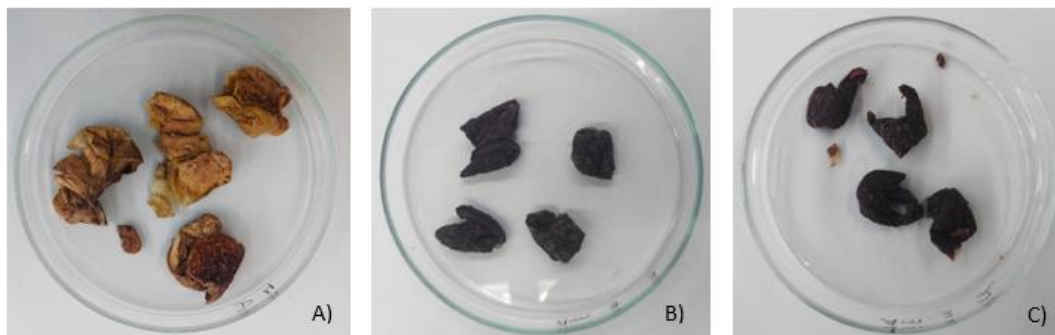
## Referências

- Ongen, G., Sargim, S., Tetik D., & Kose, T. 2005. Drying of Green Table Olives, *Food Technology and Biotechnology*. **43**(2):181–187.
- Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C., & Angelis, M. 2000. Oven-dried table olives: textural properties as related to pectic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**:1271-1276.

## Quadros e Figuras

**Quadro 1** - Caracterização física das Azeitonas da cv. Negrinha de Freixo utilizadas na secagem.

Massa (g)	Diâmetro (mm)	Cor				
		<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i>
5,5314±0,9645	23,11±1,46	53,46±4,51	1,00±1,12	32,73±3,14	33,08±2,94	88,23±2,05



**Figura 2** – Aspeto das amostras obtidas por aplicação de diferentes tipos de secagem: Liofilização 24 horas(A), Ventilação 48 horas (B) e Vácuo 96 horas (C).

**Quadro 2-** Caracterização físico-química das farinhas obtidas por liofilização, ar quente e vácuo.

	Cor				a <sub>w</sub>	Teor de Cinzas (% m.s.)	Teor de Gordura (% m.s.)
	L*	a*	b*	C			
<b>Liofilização (24h)</b>	47,96±2,79 <sup>b</sup>	6,70±0,64 <sup>a</sup>	21,55±1,41 <sup>b</sup>	22,59±1,16 <sup>b</sup>	0,536±0,045 <sup>b</sup>	16,80±0,09	59,16±2,26 <sup>a</sup>
<b>Ventilação ar (24h)</b>	26,22±5,62 <sup>a</sup>	7,45±0,59 <sup>a,b</sup>	2,69±4,59 <sup>a</sup>	8,96±1,19 <sup>a</sup>	0,644±0,1079 <sup>b</sup>	18,90±2,44	56,01±1,63 <sup>a</sup>
<b>Ventilação ar (48h)</b>	24,62±2,50 <sup>a</sup>	7,16±0,56 <sup>a</sup>	1,59±2,14 <sup>a</sup>	7,61±0,40 <sup>a</sup>	0,330±0,029 <sup>a</sup>		59,04±3,42 <sup>a</sup>
<b>Vácuo (96h)</b>	23,89±1,03 <sup>a</sup>	8,16±0,52 <sup>b</sup>	2,14±1,34 <sup>a</sup>	8,52±0,43 <sup>a</sup>	0,368±0,031 <sup>a</sup>		60,79±2,18 <sup>a</sup>

Nota: Os valores apresentados referem-se à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos (p<0,05)

**Quadro 3-** Efeito da demolha das azeitonas nas características físico-químicas das farinhas obtidas

Liofilização	Cor				a <sub>w</sub>	Teor de Cinzas % (m.s.)	Teor de Gordura % (m.s.)
	L*	a*	b*	C			
<b>Sem demolha</b>	47,96±2,79 <sup>b</sup>	6,70±0,64 <sup>ab</sup>	21,55±1,41 <sup>b</sup>	22,59±1,16 <sup>b</sup>	0,536±0,045 <sup>b</sup>	16,80±0,09 <sup>c</sup>	59,16±2,26 <sup>a</sup>
<b>Demolha de 3 dias</b>	50,74±0,85 <sup>b</sup>	5,74±0,16 <sup>a</sup>	22,90±0,28 <sup>b</sup>	23,61±0,26 <sup>b</sup>	0,447±0,018 <sup>a</sup>	13,19±0,06 <sup>b</sup>	62,69±0,24 <sup>a</sup>
<b>Demolha de 5 dias</b>	41,21±3,15 <sup>a</sup>	7,16±0,41 <sup>b</sup>	15,30±1,84 <sup>a</sup>	16,91±1,57 <sup>a</sup>	0,568±0,012 <sup>b</sup>	10,81±0,45 <sup>a</sup>	60,47±4,90 <sup>a</sup>

Nota: Os valores apresentados referem-se à média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos (p<0,05)

## **Avaliação do valor atribuído pelos consumidores ao azeite de oliveiras centenárias**

Paula Cabo<sup>1</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup>, Nuno Rodrigues<sup>1</sup> & Paula Baptista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. paulacabo@ipb.pt;

### **Resumo**

As oliveiras, as paisagens que as integram e a produção de azeite, constituem parte integrante da cultura ancestral e tradições nacionais. Atualmente, a concorrência elevada do mercado pressiona os preços e reduz o rendimento dos produtores, colocando em risco os olivais tradicionais, com custos de produção superiores. O futuro dos olivais tradicionais depende de uma diferenciação bem-sucedida visando nichos de mercado específicos. Com esta investigação pretende-se avaliar a valorização dada pelos consumidores ao azeite de oliveiras centenárias. Para tal, foi realizado um estudo transversal com base numa amostra de 1203 indivíduos. Os resultados ilustram o hábito enraizado de consumir azeite, sendo que, de uma forma geral, o azeite consumido é de qualidade elevada e de origem regional. Os resultados mostram que uma parte significativa dos entrevistados (45,4%) conhece/consome azeite de oliveiras centenárias e tem uma imagem positiva. Os fatores diferenciadores mais frequentemente sinalizados foram “características únicas”, “tradicional”, “maior qualidade” e “confiança no sabor”. Por último, embora 16,2% dos entrevistados veja o produto como de “preço elevado”, apenas 18,9% não está disposto a pagar mais por uma garrafa do mesmo, mas a maioria dos consumidores que favorece a avaliação económica dessa diferenciação apenas considera um aumento de preço até 25%.

**Palavras-chave:** Azeite; Consumidor; Comportamento; Atitudes, Disposição a Pagar.

### **Abstract**

Olive trees, their unique landscape and the production of olive oil, are part of the ancestral culture and Mediterranean traditions. Its importance remains in the present day, especially in low-density producing regions. Current strong competition in the olive oil market puts pressure on prices and reduces producers' income, putting at risk traditional olive groves given its high production costs. The future of traditional olive groves depends on successful differentiation targeting specific market niches. A cross-sectional study was carried out based on a sample of 1203 individuals. Results show that a significant part of respondents (45.4%) known/consumed olive oil from centenary trees and have a positive image of it, linked to attributes as "quality", "organoleptic characteristics", and preservation of cultural "heritage" and "biodiversity". The differentiating factors most frequently signalled were "unique characteristics", "traditional", "higher quality" and "confidence in flavour". Even though 16.2% of the respondents see the product as "high price", only 18.9% is not willing to pay more for a bottle of it. Still, the majority of consumers favouring the economic valuation of such differentiation only ponders a price increase lesser than 25%.

**Keywords:** Olive oil; Consumer; Attitudes, Perception, Preferences, Willingness to pay.

## Introdução

As oliveiras, as paisagens que as integram e a produção de azeite, constituem parte integrante da cultura ancestral e tradições nacionais. O mercado mundial do azeite exhibe um elevado dinamismo, traduzido no crescimento significativo da produção e consumo, impulsionados pelo crescente reconhecimento das suas qualidades nutricionais e benefícios para a saúde humana. Em Portugal, o setor olivícola assume uma importância económica crescente, estimulado pelo reconhecimento nacional e internacional da qualidade do azeite português. Tal reflete-se no crescimento do volume de produção motivado por incrementos na produtividade, com a instalação dos novos olivais de regadio, bem como, nas tecnologias de produção e aumento da capacidade instalada dos lagares.

Atualmente, a olivicultura nacional é composta, em grande parte, por dois sistemas de produção antagónicos, com vantagens competitivas específicas: o novo olival intensivo e super-intensivo (de regadio, com maior dimensão das parcelas/propriedades e mecanização da quase totalidade do ciclo produtivo) produz azeites de qualidade a baixo custo; e o olival tradicional (de sequeiro, com menor dimensão e de difícil mecanização) produz azeites de qualidade a um custo mais elevado, mas com características bem marcadas respeitantes ao *terroir* e às distintas cultivares tradicionais que lhes dão origem.

Neste contexto, a aposta na qualidade e diferenciação/singularidade do produto através da produção e comercialização de azeites obtidos a partir de oliveiras centenárias, cuja procura tem vindo a aumentar, sobretudo nos mercados internacionais, assume-se assim como uma estratégia a equacionar por estes produtores.

De acordo com a literatura, vários fatores são cruciais para influenciar as decisões de compra dos consumidores, sendo os mais importantes a região ou país de origem, a denominação de origem (DOP ou Indicação Geográfica Protegida - IGP), a certificação biológica, o sabor e aparência, a embalagem e o preço (Ribeiro & Santos, 2005; Santos, 2008; Olivas et al., 2009; Delgado & Guinard, 2011; Dekhili et al., 2011; Mtimet et al., 2011; Aprile et al., 2012; Recchia et. al., 2012; Di Vita et al., 2013; Giudice et al., 2015; Di Vita et al., 2013; Mtimet et. al., 2013; Santosa et al., 2013; Valli et. al., 2014; Vazquez-Araujo et. al., 2015; Spence, 2015; Barbieri et. al., 2015; Cabo et al., 2017).

Por outro lado, os olivais são uma característica intrínseca da paisagem rural portuguesa. A preservação da paisagem tradicional pode ser de particular interesse no caso das oliveiras centenárias, nas quais a produção de azeite é uma evidência da integração harmoniosa da produção, do ambiente e da cultura na região. A exemplo, a literatura apresenta evidências que a qualidade da paisagem do local de produção pode influenciar a perceção do sabor e as escolhas de compra dos consumidores de produtos alimentares, como o vinho e a carne (Tempesta et al., 2010, 2014; Troiano et al., 2016; Torquati et al., 2018). Também Tempesta & Vecchiato (2019), num estudo relativo a consumidores de azeite extra virgem da região italiana de Veneto, concluem que o sistema de cultivo do olival que permite a preservação das paisagens tradicionais apresenta um efeito significativo no comportamento do consumidor apenas para alguns segmentos de mercado. Resultado que o autor explica pela relativamente pequena área olivícola presente na região em estudo, pelo que as pessoas que vivem na região poderão não ter conhecimento direto desse tipo de paisagem.

Com esta investigação pretende-se avaliar a valorização dada pelos consumidores ao azeite de oliveiras centenárias. Nomeadamente, compreender o comportamento dos consumidores portugueses relativamente ao azeite de oliveiras centenárias, as suas perceções, atitudes e hábitos de compra/consumo, bem como, identificar o valor atribuído a esta produção diferenciada.

## Material e Métodos

Para tal, procedeu-se à construção de um questionário visando recolher informação relativa ao consumo e que possibilitasse traçar o perfil dos consumidores de azeite de oliveiras centenárias, conhecer os seus hábitos de compra e consumo e a valorização dada ao produto. O questionário foi aplicado diretamente a uma amostra acidental de potenciais consumidores de azeite, online e presencialmente, no 2º semestre de 2017 e 1º semestre de 2018. Em resultado, realizou-se um estudo *cross-section* com base numa amostra não probabilística constituída por 1203 indivíduos, dos quais 99,3% eram consumidores de azeite.

## Resultados e discussão

A amostra resultante incluía consumidores com idades compreendidas entre 18 e 87 anos (média de 44,12 anos; DP = 12,185). A maioria era do género feminino (56%), estava empregado (87,9%), parte significativa ligada ao ensino e investigação (13%), ao mundo empresarial (10% gestores/economistas e 7% empresários) e à atividade agrícola (essencialmente, técnicos agrícolas, zootécnicos e agricultores), possuía habilitações literárias ao nível do ensino superior (84,3%) e vivia em agregados familiares de 2 (23,5%), 3 (24%) e 4 pessoas (28,9%), em ambiente urbano (77,5%) e em território nacional (94%). São indivíduos que manifestam ser consumidores social e ambientalmente conscientes, informados, com atenção ao fator saúde e à preservação do ambiente e à biodiversidade, no seu dia-a-dia.

Os resultados evidenciam o hábito arraigado de consumo de azeite (84% consome o produto diariamente e, 15,5%, fá-lo entre uma a três vezes por semana), sendo que, de uma forma geral, o azeite consumido é de qualidade elevada, sendo o azeite preferido é virgem extra (69%, 824 respondentes) e virgem (30%, 337 respondentes).

O grau de familiaridade com inquiridos com o azeite de oliveiras centenárias é significativo, sendo que grande parte dos inquiridos (45,4%) conhece/já ouviu falar azeite de oliveiras centenárias, sendo parte significativa destes capaz de identificar marcas comerciais a operar no mercado. A familiaridade com o produto deve-se aos grupos sociais primários (família e amigos), à internet e comunicação social. O percurso formativo e os grupos sociais secundários desempenham igualmente um papel crucial de divulgação de informação (Fig. 1). Adicionalmente, a grande maioria destes respondentes (457 indivíduos) afirma possuir uma imagem positiva do azeite de oliveiras centenárias, vinculada a atributos como "qualidade", "características organoléticas" e preservação do "património" cultural e "biodiversidade". Apenas oito inquiridos associam o produto a uma estratégia de marketing e três outros têm uma imagem negativa do mesmo.

A proporção de respondentes com experiência de compra/consumo de azeite de oliveiras centenárias (344 indivíduos, i.e., 29% dos respondentes), embora menor, é bastante relevante dada a fase introdutória do ciclo de vida do produto desta produção diferenciada. Ademais, face à escolha por produções diferenciadas (Denominação de Origem Protegida, Biológico, de Quinta ou de Oliveiras Centenárias), parte significativa (43%) destes respondentes elege o azeite de oliveiras centenárias. Esta escolha assenta nas características diferenciadoras do produto percecionadas pelos respondentes, sendo que a maioria dos consumidores de azeite de oliveiras centenárias perceciona, como características diferenciadoras, a singularidade do produto, associada a características únicas e maior qualidade, aliado ao sistema de produção tradicional e à origem regional (Fig. 2).

Por outro lado, quando questionados sobre a importância atribuída ao azeite de oliveiras centenárias ao produto, refletida na “disposição a pagar mais” pelo produto,

apesar de 16,2% dos respondentes associar o azeite de oliveiras centenárias a “preço elevado” apenas 18,9% não está disposto a pagar mais por uma garrafa do mesmo. Ainda assim, a maioria dos consumidores que favorece a avaliação económica dessa diferenciação apenas considera um aumento de preço inferior a 25% (Fig. 3).

Salvo melhor informação, não existe qualquer estudo envolvendo a disposição a pagar por azeite de oliveiras centenárias. Estes resultados são, todavia, similares aos obtidos para outras produções diferenciadas para Portugal. Cabo et. al., (2017), por exemplo, num estudo relativo a consumidores de azeite biológico, referem que apesar destes avaliarem positivamente o azeite biológico relativamente ao azeite proveniente da agricultura convencional, tal facto não se reflete em níveis superiores de “disposição a pagar mais” pelo produto: a grande maioria dos inquiridos (58%) apenas estaria disposta a pagar diferenciais de preço até 10% e apenas 3% estaria disposta a pagar diferenciais superiores a 30%. Enquanto que, no mercado nacional, o diferencial de preços entre azeite biológico e azeite proveniente de agricultura convencional, seria em média, de 40% (Santos, 2008; Borges, 2018).

### **Conclusões**

Com esta investigação pretende-se avaliar a valorização dada pelos consumidores ao azeite de oliveiras centenárias. Os resultados mostram que uma parte significativa dos entrevistados (45,4%) conhece/consome azeite de oliveiras centenárias e tem uma imagem positiva. Os fatores diferenciadores mais frequentemente sinalizados foram “características únicas”, “tradicional”, “maior qualidade” e “confiança no sabor”. Por último, embora 16,2% dos entrevistados veja o produto como de “preço elevado”, apenas 18,9% não está disposto a pagar mais por uma garrafa do mesmo, mas a maioria dos consumidores que favorece a avaliação económica dessa diferenciação apenas considera um aumento de preço inferior a 25%. É ainda necessário efetuar o estudo analítico dos dados recolhidos por forma a identificar os eventuais perfis do consumidor de azeite de oliveiras centenárias.

O futuro dos olivais tradicionais depende de uma diferenciação bem-sucedida visando nichos de mercado específicos. Para tal, afigura-se fundamental o desenvolvimento e implementação de uma estratégia de marketing coerente, baseada no conhecimento do comportamento do consumidor, adoptando um posicionamento/segmentação e estratégia de marketing mix efetiva, que permita a comunicação eficaz da diferenciação e/ou singularidade deste azeite ao potencial consumidor. Neste ponto salienta-se que o desconhecimento e ceticismo quanto à real diferenciação do “azeite de oliveiras centenárias” foram apontados como os motivos mais frequentes para a indiferença/imagem negativa associada ao azeite de oliveiras centenárias e à não disposição a pagar mais pelo mesmo. Ainda assim, apesar da oferta reduzida no mercado nacional, a familiaridade dos respondentes com o produto e a notoriedade de algumas das marcas já instaladas é significativa.

Por último, os autores realçam a forte ligação cultural e histórica do país a esta atividade. A cultura do olival movimenta uma atividade movida por tradições, cuja importância ultrapassa o seu valor económico, pelo efeito multiplicador na ocupação do espaço rural, na promoção da identidade dos territórios, da gastronomia e preservação da paisagem tradicional, no fomento do turismo e indústria a montante. Ademais da sua função produtiva, olival tradicional apresenta características distintivas cruciais, seja pela diminuição do efeito poluente da agricultura (uso reduzido dos fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos), extensificação e/ou manutenção dos sistemas agrícolas tradicionais extensivos (sendo conduzido em regime extensivo de sequeiro, segundo práticas

tradicionais de agricultura, contribui para a manutenção do “mosaico” agrícola na paisagem portuguesa, caracterizada pela sua heterogeneidade de culturas agrícolas praticadas), conservação dos recursos (por apresentarem cultivares tradicionais com enorme potencial genético que urge preservar/potenciar), sendo ainda uma característica intrínseca da paisagem rural portuguesa.

### **Referências**

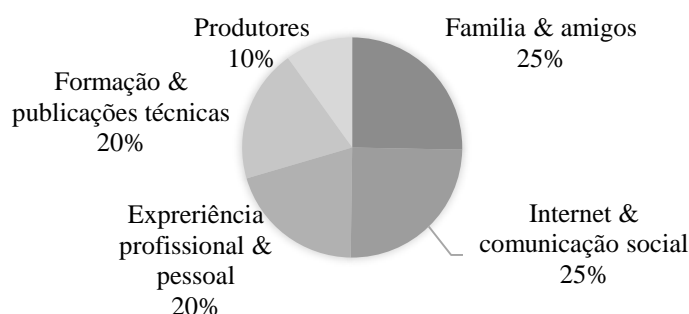
- Aprile M.; Caputo V. & Nayga R. 2012. Consumers' valuation of food quality labels: the case of the european geographic indication and organic farming labels. *International Journal of Consumer Studies* 36 (2): 158-165
- Barbieri S, Bendini A, Valli E. & Gallina Toschi T. 2015. Do consumers recognize the positive sensorial attributes of extra virgin olive oils related with their composition? A case study on conventional and organic products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44:186–195.
- Borges, I. 2018. Análise da cadeia de valor do azeite biológico em Portugal. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.
- Cabo, P., Matos, A., Fernandes, A. & Ribeiro, M.I. 2017. Azeite biológico: da produção ao consumo. *Revista Egitania Scientia* 20:2: 95-113
- Dekhili S.; Sirieix L. & Cohen E. 2011. How consumers choose olive oil: the importance of origin cues. *Food Quality and Preference* 22 (8): 757-762
- Delgado, C. & Guinard, J-X. 2011. How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings? *Food Quality and Preference*, 22(2):213–225.
- Di Vita, G.; D'amico, M., La Via, G. & Caniglia, E. 2013. Quality perception of PDO extra-virgin olive oil: which attributes most influence italian consumers? *Agricultural Economics Review* 14(2):46-58.
- Giudice, T., Cavallo, C., Caracciolo, F. & Cicia, G. 2015. What attributes of extra virgin olive oil are really important for consumers: a meta-analysis of consumers' stated preferences. *Agricultural and Food Economics* 3: 20.
- Mtimet, N., Ujiie, K., Kashiwagi, K., Zaibet, L. & Nagaki, M. 2011. “The effects of information and country of origin on japanese olive oil consumer selection”. 2011 International Congress of European Association of Agricultural Economists, Zurich, Switzerland. p. 113.
- Mtimet, N., Zaibet, L., Zairi, C. & Hzami, H. 2013. Marketing olive oil products in the tunisian local market: the importance of quality attributes and consumers' behavior. *Journal of international food and agribusiness marketing* 25: 134–145.
- Olivas, R., Díaz, M., Olmeda, M. & Bernabéu, R. 2009. Oportunidades comerciales para el aceite de oliva de castilla-la mancha. *Grasas Y Aceites* 60 (5): 525-533.
- Recchia A, Monteleone E. & Tuorila H. 2012. Responses to extra virgin olive oils in consumers with varying commitment to oils. *Food Quality and Preference* 24(1):153–161.
- Ribeiro, J. & Santos, J. 2005. Portuguese olive oil and the price of regional products: does designation of origin really matter? *Tékhnē Tékhnē: Revista de Estudos Politécnicos* 2 (3): 61-76.
- Santos, S. 2008. Mercado e estratégias de marketing do azeite biológico em Portugal. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia.

- Santosa, M., Clow, E., Sturzenberger, N. & Guinard J-X. 2013. Knowledge, beliefs, habits and attitudes of california consumers regarding extra virgin olive oil. *Food Research International* 54(2):2104–2111.
- Tempesta, T. & Vecchiato, D. 2019. Analysis of the Factors that Influence Olive Oil Demand in the Veneto Region (Italy). *Agriculture* 9(7):1-17.
- Tempesta, T.; Giancristofaro, R.A.; Corain, L.; Salmaso, L.; Tomasi, D. & Boatto, V. 2010. The importance of landscape in wine quality perception: An integrated approach using choice-based conjoint analysis and combination-based permutation tests. *Food Quality and Preference* 21: 827–836.
- Tempesta, T.; Vecchiato, D.; Djumboung, D.A. & Chinazzi, G. 2014. An analysis of the potential effects of the modification of the Prosecco Protected Designation of Origin: a choice experiment. *International Agricultural Policy* 2:33–48.
- Torquati, B.; Tempesta, T.; Vecchiato, D. & Venanzi, S. 2018. Tasty or Sustainable? The Effect of Product Sensory Experience on a Sustainable New Food Product: An Application of Discrete Choice Experiments on Chianina Tinned Beef. *Sustainability* 10, 2795.
- Troiano, S.; Marangon, F.; Tempesta, T. & Vecchiato, D. 2016. Organic vs local claims: Substitutes or complements for wine consumers? A marketing analysis with a discrete choice experiment. *New Medit* 15:14–21.
- Valli E, Bendini A, Popp M. & Bongartz A. 2014. Sensory analysis and consumer acceptance of high-quality extra virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(10):2124–2132.
- Vazquez-Araujo, L.; Adhikari, K.; Chambers, E. 4<sup>th</sup>; Chambers, DH & Carbonell-Barrachina, A. 2015. Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Science and Technology International* 21(6):454–466.

### Agradecimentos

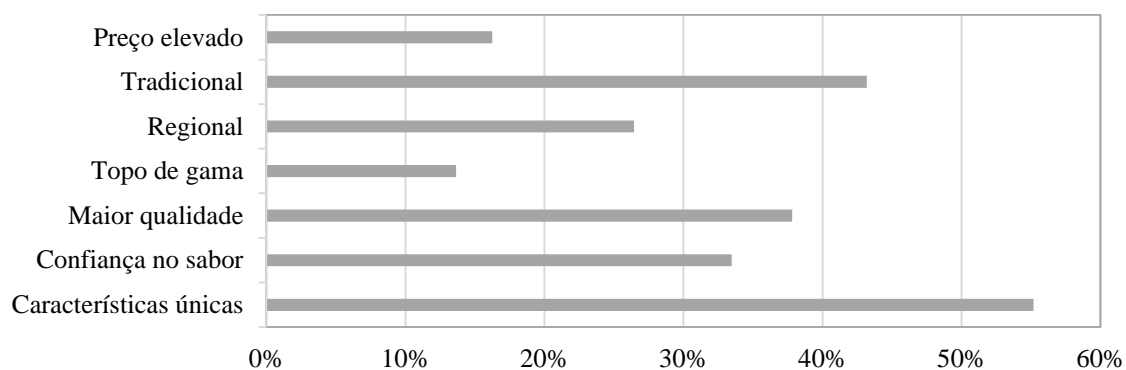
Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020) através de fundos nacionais FCT/MCTES. Nuno Rodrigues agradece a “Fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito da celebração do contrato-programa de emprego científico institucional”.

### Quadros e Figuras

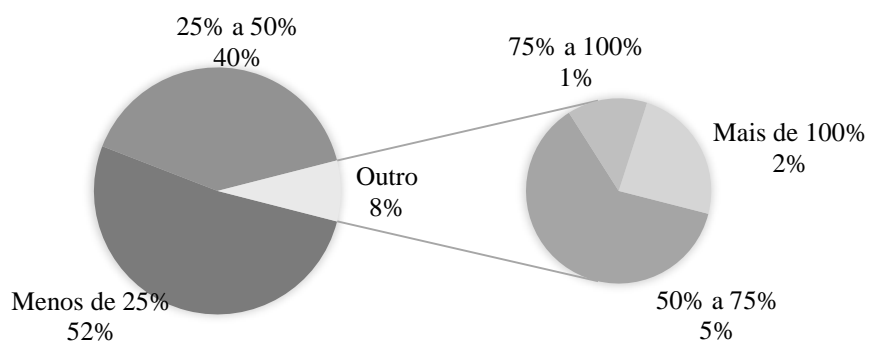


**Figura 1** - Fonte do conhecimento sobre o azeite de oliveiras centenárias (N=537).





**Figura 2** - Características diferenciadoras do azeite de oliveiras centenárias percecionadas pelos compradores/consumidores (N=344).



**Figura 3** - Distribuição da disposição a pagar a mais por azeite de oliveiras centenárias (N=628).

## **Conhecimentos, preferências e hábitos de consumo relativamente ao azeite em Portugal**

Paula Cabo<sup>1</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup>, Nuno Rodrigues<sup>1</sup> & Paula Baptista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal. paulacabo@ipb.pt;

### **Resumo**

O mercado mundial de azeite apresenta um elevado dinamismo, com um crescimento significativo na produção e consumo, impulsionado pelo reconhecimento das suas qualidades nutricionais e benefícios para a saúde humana. Em Portugal, o setor olivícola assume uma importância económica crescente, estimulado pelo reconhecimento nacional e internacional da qualidade do azeite português. Com esta investigação pretendeu-se compreender o comportamento dos consumidores de azeite em Portugal. Foi realizado um estudo transversal com base numa amostra de 1203 indivíduos. Os resultados ilustram o hábito enraizado de consumo de azeite, com predominância dos circuitos curtos de comercialização. Os fatores mais valorizados na compra/consumo de azeite foram o benefício para a saúde, o sabor e aroma, o respeito pelo ambiente, o valor nutricional e a região de origem. Quanto às preferências dos consumidores, os inquiridos favorecem o consumo de azeite nacional e apenas 1,6% dos inquiridos afirmaram não se importar com a origem do azeite consumido. No que respeita ao tipo de azeite normalmente consumido, o azeite favorito é virgem extra (69%), seguido do azeite virgem, azeite de quinta e azeite com denominação de origem protegida (30%). Os azeites biológicos (21,4%), monovarietal (9%) e de oliveiras centenárias (12,7%) também são frequentemente procurados.

**Palavras-chave:** Azeite; Consumidor; Comportamento; Preferências.

### **Abstract**

The world olive oil market shows high dynamic, with significant growth in production and consumption, driven by the recognition of its nutritional qualities and benefits to human health. In Portugal, the olive sector has a growing economic importance, stimulated by the national and international recognition of the quality of Portuguese olive oil. This research aims to understand the behaviour of olive oil consumers in Portugal. A cross-sectional study was carried out based on a sample of 1203 individuals. Results illustrate a rooted habit of consuming olive oil and the predominance of short marketing circuits. The most valued factors in the purchase/consumption of olive oil were the benefit to health, taste and aroma, respect for the environment, nutritional value and region of origin. With regard to consumer preferences, the respondents favour the consumption of domestic olive oil, and only 1.6% of them did not care about the origin of the olive oil consumed. As regards the type of olive oil usually consumed, the favourite olive oil is extra virgin (69%), seconded by virgin olive oil, from farm and with protected designation of origin (30%). organic olive oil (21.4%), monovarietal olive oil (9%) and olive oil from centenary trees (12.7%) are also frequently sought.

**Key-words:** Olive oil; Consumer; Attitudes, Perception, Preferences.

## Introdução

Historicamente, a produção de azeite tem desempenhado um papel fundamental na economia nacional, em termos de rendimento e emprego. O setor do azeite assume uma importância económica crescente no complexo agroalimentar português. Em 2017, o valor da produção nacional de azeite era de 122,5 milhões de euros, respondendo por 2,9% da produção vegetal do ramo agrícola (INE, 2019).

O setor apresenta um elevado dinamismo. Em 10 anos a produção duplicou graças a ganhos de produtividade com a instalação de novos olivais, melhoria das tecnologias de produção e aumento da capacidade de transformação e concentração dos lagares industriais. A evolução dos preços do azeite, em especial no azeite virgem extra e virgem, e o reconhecimento nacional e internacional da qualidade do azeite português, impulsionaram a autossuficiência do país e o crescimento das exportações. Com uma elevada orientação exportadora, o setor apresenta uma balança comercial superavitária (149 milhões de euros, em 2017). Todavia, a capitação média apresenta-se oscilante, sofrendo uma queda global superior a 9%, na última década (de 7,6 quilogramas/ano, média de 2008-2010, para 6,9 quilogramas/ano, média de 2015-2017) (INE, 2019).

A compreensão dos fatores que influenciam as perceções, atitudes, gostos e preferências dos consumidores de azeite assume-se como fundamental para o sucesso de qualquer estratégia comercial e apresenta benefícios para todo o setor. Os diferentes intervenientes da cadeia de valor poderão usar a informação no desenvolvimento de produto, adequando a oferta às necessidades e desejos dos consumidores, possibilitando uma segmentação mais eficiente do mercado e a potencial exploração de mercados novos e emergentes.

A literatura relativa ao comportamento do consumidor realça que a procura de produtos alimentares depende da qualidade esperada, sendo os atributos e indicadores de qualidade elementos-chave na determinação das expectativas de qualidade dos consumidores (Nelson, 1970; Wilde, 1980; Steenkamp, 1990; Andersen, 1994). A teoria económica relativa ao comportamento do consumidor refere que os atributos de qualidade estão vinculados ao conhecimento do produto, podendo ser: (a) atributos de experiência, os quais podem ser percebidos durante o consumo que, no contexto específico dos alimentos, incluem o aroma e sabor; ou (b) atributos de credibilidade, como benefícios à saúde ou ao meio ambiente, os quais não podem ser avaliados diretamente, mesmo durante o consumo, apesar de desempenhar um papel importante, na avaliação do consumidor. Face à dificuldade em conhecer os atributos de qualidade antes do uso, os consumidores usam indicadores de qualidade para inferir a qualidade dos produtos. Estes podem ser detetados antes do consumo e estão relacionadas com as características físico-químicas e sensoriais do produto (intrínsecas), bem como, características que não fazem parte fisicamente do produto (extrínsecas), como preço, marca, embalagem, região ou país de origem.

A evidência empírica identifica como atributos mais relevantes para o consumidor na decisão de compra/consumo de azeite, os atributos extrínsecos do produto (preço, origem ou variedade), enquanto os atributos intrínsecos (cor ou sabor), são relegados para segundo plano. Neste sentido, independentemente da variedade do azeite, o preço é o atributo que surge em primeiro lugar, enquanto o sabor é o atributo extrínseco mais amplamente destacado (Ribeiro & Santos, 2005; Santos, 2008; Olivas et al., 2009; Dekhili et al., 2011; Mtimet et al., 2011; Aprile et al., 2012; Di Vita et al., 2013; Giudice et al., 2015). Os autores realçam, igualmente, a importância do atributo origem, nas suas várias especificações (Denominação de Origem Protegida -DOP, Indicação Geográfica Protegida - IGP) e certificações privadas dos países de origem. Este atributo é mais

valorizado entre os consumidores de países produtores, pela maior familiaridade com o produto. Quanto às características organoléticas do azeite, a literatura evidencia um padrão em termos de diferentes percepções, atitudes, gostos e preferências dos indivíduos pela cor e sabor do azeite. Na percepção dos consumidores os azeites muito pálidos são, amiúde, associados a um produto mais barato, com menos sabor (o azeite refinado está associado a uma cor muito mais clara e mais pálida). Por outro lado, os consumidores com maior familiaridade/exposição a azeite de alta qualidade são mais propensos a apreciar os atributos de sabor, enquanto os consumidores acostumados a azeite com sabor suave (por uma diversidade de razões) preferem esse azeite, em detrimento de azeite com sabor mais intenso (Delgado & Guinard, 2011; Recchia et. al., 2012; Di Vita et al., 2013; Mtimet et. al., 2013; Santosa et al., 2013; Valli et. al., 2014; Barbieri et. al., 2015; Spence, 2015; Vazquez-Araujo et. al., 2015).

Com o presente trabalho pretende-se compreender o comportamento dos consumidores de azeite em Portugal, nomeadamente, as suas percepções, atitudes, gostos e preferências, hábitos de compra e consumo de azeite.

### **Material e Métodos**

Para tal, procedeu-se à construção de um questionário visando recolher informação relativa ao consumo e que possibilitasse traçar o perfil dos consumidores de azeite de oliveiras centenárias, conhecer os seus hábitos de compra e consumo e a valorização dada ao produto. O questionário foi aplicado diretamente a uma amostra acidental de potenciais consumidores de azeite, online e presencialmente, no 2º semestre de 2017 e 1º semestre de 2018. Em resultado, realizou-se um estudo *cross-section* com base numa amostra não probabilística constituída por 1203 indivíduos, dos quais 99,3% eram consumidores de azeite.

### **Resultados e discussão**

A amostra resultante incluía consumidores com idades compreendidas entre 18 e 87 anos (média de 44,12 anos; DP = 12,185). A maioria era do género feminino (56%), estava empregado (87,9%), parte significativa ligada ao ensino e investigação (13%), ao mundo empresarial (10% gestores/economistas e 7% empresários) e à atividade agrícola (essencialmente, técnicos agrícolas, zootécnicos e agricultores), possuía habilitações literárias ao nível do ensino superior (84,3%) e vivia em agregados familiares de 2 (23,5%), 3 (24%) e 4 pessoas (28,9%), em ambiente urbano (77,5%) e em território nacional (94%). São indivíduos que manifestam ser consumidores social e ambientalmente conscientes, informados, com atenção ao fator saúde e à preservação do ambiente e à biodiversidade, no seu dia-a-dia.

A percepção do consumidor, no contexto do comportamento de compra de um determinando produto, resulta de um processo dedutivo, em que a família, os amigos e a publicidade são importantes veículos de informação. Os estudos demonstram ainda que o grau de conhecimento e consciencialização sobre os alimentos exerce uma influência positiva na atitude e, conseqüentemente, no comportamento do consumidor quanto ao consumo. Neste sentido, os inquiridos foram questionados sobre o nível de conhecimento relativamente ao produto e respetivas fontes de informação. A sua percepção quanto ao grau de conhecimento relativamente ao produto é, na maioria, médio (48,5%); sendo que apenas 14,5% considera possuir um grau conhecimento elevado. Este conhecimento tem maioritariamente origem em familiares/amigos (55%) e experiência profissional (30%) e formativa (22%), em detrimento das formas menos pessoais, como a internet e redes sociais (19%) ou a imprensa generalista (17,7%) e especializada (8,4%).

No que respeita a hábitos de consumo os resultados evidenciam o hábito arraigado de consumo de azeite (84% consome o produto diariamente e 15,5%, fá-lo entre uma a três vezes por semana). De uma forma geral, o azeite consumido é de qualidade elevada (Fig. 1), sendo que apenas 4% refere consumir azeite (contém uma mistura de azeite refinado com azeite virgem). Os inquiridos têm preferência pelo consumo azeite de origem regional (Fig. 2), sendo que apenas 1,6% afirma ser indiferente a origem do azeite que consome. Os consumidores de azeite não nacional elegem os azeites originários de Espanha e Itália, Brasil, Tunísia e Malta.

No respeitante a produções diferenciadas os resultados mostram que parte significativa dos consumidores inquiridos dá preferência ao consumo de azeite de quinta e com denominação de origem (30%) e em modo de produção biológico, comumente designado de biológico (21,4%) (Fig. 3). Os segmentos de consumidores de azeite de oliveiras centenárias (12,7%) e de azeite monovarietal (9%), embora de menor dimensão, são também relevantes, sendo nichos de mercado potencialmente atrativos, particularmente, para os pequenos produtores de olival tradicional pelas características distintivas das cultivares autóctones.

Os resultados referentes aos hábitos de compra mostram que cerca de 10% dos consumidores respondentes não tem por hábito comprar azeite, seja porque é produtor ou porque tem familiares/amigos produtores. Quanto ao resto, predominam os circuitos curtos de comercialização e os mercados de proximidade, com preferência para a compra direta ao produtor/lagar (45,5%), a amigos, conhecidos e familiares (34,3%) e no mercado local (9,7%). O retalho generalista (43,9%) e especializado (11,4%) são igualmente importantes. A importância dos circuitos curtos de comercialização agroalimentar tem sido salientada por vários autores apontando os benefícios sociais, económicos e ambientais deste modo de comercialização de maior proximidade. Entre as vantagens apontadas incluem-se reduzir as distâncias entre produtor e consumidor, melhorar a segurança alimentar e a qualidade dos produtos no consumidor, favorecer a adoção de práticas agrícolas mais respeitadoras do ambiente, fortalecer a economia local e reforçar o capital social (Baptista et al., 2013; Tibério et al., 2013).

Os fatores mais valorizados na compra/consumo de azeite foram, de um modo geral, atributos de credibilidade, como o benefício para a saúde e o respeito pelo ambiente, e atributos de experiência, como o sabor e aroma. Atributos extrínsecos, como o preço, a marca, e embalagem, mostraram-se menos decisivos no comportamento de compra/consumo (Fig. 4). Estes resultados são, em certa medida, distintos dos evidenciados noutros estudos cujas conclusões apontam como mais importante para o consumidor no ato de compra, os atributos extrínsecos do produto (preço, origem ou cultivar), enquanto os atributos intrínsecos são relegados para segundo plano. Realce também para o atributo origem, cuja importância, entre os consumidores de países produtores, é salientada pela literatura. Tal é também evidenciado na presente investigação, sendo que, entre os atributos extrínsecos, é a origem que possui maior importância na decisão de compra dos consumidores, como comprovado pelo reduzido número de consumidores alheio à origem do azeite que consome. Quanto às características organoléticas do azeite, as preferências dos consumidores inquiridos vão para o sabor doce (36%) e picante (25,5%); a cor verde (31%) e intermédio (29%); com intensidade de sabor e aroma, intermédio e intenso. Estes resultados estão em linha com outros estudos relativos a países com tradição na produção de azeite, como Espanha, Itália e Tunísia (Mtimet et. al., 2013; Di Vita et al., 2013; Vazquez-Araujo et. al., 2015).

## Conclusões

Com esta investigação pretende-se compreender o comportamento do consumidor nacional, nomeadamente, as suas percepções e hábitos de compra e consumo de azeite. Os resultados ilustram o hábito enraizado de consumo de azeite e a predominância de circuitos curtos de comercialização e dos mercados de proximidade, com a preferência pela compra diretamente ao produtor/lagar. Os fatores mais valorizados na compra/consumo de azeite foram o benefício para a saúde, o sabor e aroma, o respeito pelo ambiente, o valor nutricional e a região de origem. Quanto às preferências dos consumidores, os inquiridos favorecem o consumo de azeite nacional e apenas 1,6% dos inquiridos afirmaram não se importar com a origem do azeite consumido. No que respeita ao tipo de azeite normalmente consumido, o azeite favorito é virgem extra (69%), seguido do azeite virgem, azeite de quinta e azeite com denominação de origem protegida (30%). O azeite biológico (21,4%), azeite monovarietal (9%) e azeite de oliveiras centenárias (12,7%) também são frequentemente procurados.

Na opinião dos autores, é necessário concertar estratégias de valorização do setor que passem pela ligação a outros produtos com qualidade certificada produzidos no País, mas também pela promoção da identidade dos territórios, da sua gastronomia e pela preservação da paisagem tradicional, nomeadamente, através do seu potencial ligado ao turismo. A relação entre os produtos locais, a gastronomia e turismo constitui uma simbiose perfeita em áreas rurais, considerando o seu potencial para o desenvolvimento de diferentes atividades e experiências, como é o caso do azeite e do oliveturismo.

## Referências

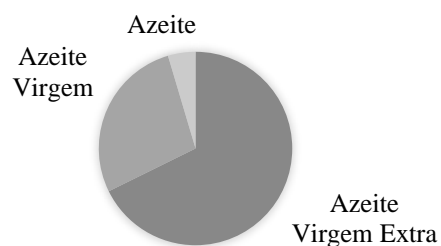
- Andersen, E.S. 1994. The evolution of credence goods: a transaction approach to product specification and quality control. In Working Paper; Mapp-Centre for Research On Customer Relations in the Food Sector: Aarhus, Denmark.
- Aprile M.; Caputo V. & Nayga R. 2012. Consumers' valuation of food quality labels: the case of the european geographic indication and organic farming labels. *International Journal of Consumer Studies*, 36 (2): 158-165
- Baptista, A., Cristóvão, A., Rodrigo, I. & Tibério, L. .2013. Parcerias, ação coletiva e desenvolvimento de sistemas alimentares localizados: o projeto prove em Portugal. *Perspectivas Rurales. Nueva época* 23:12-31.
- Barbieri S, Bendini A, Valli E. & Gallina Toschi T. 2015. Do consumers recognize the positive sensorial attributes of extra virgin olive oils related with their composition? A case study on conventional and organic products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44:186–195.
- Dekhili S.; Sirieix L. & Cohen E. 2011. How consumers choose olive oil: the importance of origin cues. *Food Quality and Preference*, 22 (8): 757-762
- Delgado, C. & Guinard, J-X. 2011. How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings? *Food Quality and Preference*, 22(2):213–225.
- Di Vita, G.; D'amico, M., La Via, G. & Caniglia, E. 2013. Quality perception of PDO extra-virgin olive oil: which attributes most influence italian consumers? *Agricultural Economics Review*, 14(2):46-58.
- Giudice, T., Cavallo, C., Caracciolo, F. & Cicia, G. 2015. What attributes of extra virgin olive oil are really important for consumers: a meta-analysis of consumers' stated preferences. *Agricultural and Food Economics*, 3: 20.
- INE (2019). Instituto Nacional de Estatística, Lisboa. [www.ine.pt](http://www.ine.pt)

- Mtimet, N., Ujiie, K., Kashiwagi, K., Zaibet, L. & Nagaki, M. 2011. "The effects of information and country of origin on japanese olive oil consumer selection". 2011 International Congress of European Association of Agricultural Economists, Zurich, Switzerland. p. 113.
- Mtimet, N., Zaibet, L., Zairi, C. & Hzami, H. 2013. Marketing olive oil products in the tunisian local market: the importance of quality attributes and consumers' behavior. *Journal of international food and agribusiness marketing* 25: 134–145.
- Nelson, P. 1970. Information and Consumer Behavior. *Journal of Political Economy*, 78: 311–329.
- Olivas, R., Díaz, M., Olmeda, M. & Bernabéu, R. 2009. Oportunidades comerciales para el aceite de oliva de castilla-la mancha. *Grasas Y Aceites* 60 (5): 525-533.
- Recchia A, Monteleone E. & Tuorila H. 2012. Responses to extra virgin olive oils in consumers with varying commitment to oils. *Food Quality and Preference* 24(1):153–161.
- Ribeiro, J. & Santos, J. 2005. Portuguese olive oil and the price of regional products: does designation of origin really matter? *Tékhnē Tékhnē: Revista de Estudos Politécnicos* 2 (3): 61-76.
- Santosa, M., Clow, E., Sturzenberger, N. & Guinard J-X. 2013. Knowledge, beliefs, habits and attitudes of california consumers regarding extra virgin olive oil. *Food Research International* 54(2):2104–2111.
- Spence C. 2015. On the psychological impact of food colour. *Flavour*, 4(1):1–16.
- Steenkamp, J.-B.E.M. 1990. Conceptual model of the quality perception process. *Journal of Business Research* 21: 309–333.
- Tibério, L., Baptista, A. & Cristóvão, A. (2013), "Sistemas Agroalimentares Locais e Comercialização em Circuitos Curtos de Proximidade", *Revista Rede Rural Nacional*, (online), 3. <http://www.rederural.pt/index.php/pt/emrede/revista-da-rnn>
- Valli E, Bendini A, Popp M. & Bongartz A. 2014. Sensory analysis and consumer acceptance of high-quality extra virgin olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(10):2124–2132.
- Vazquez-Araujo, L.; Adhikari, K.; Chambers, E. 4<sup>th</sup>; Chambers, DH & Carbonell-Barrachina, A. 2015. Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Science and Technology International* 21(6):454–466.
- Wilde, L.L. 1980. The economics of consumer information acquisition. *The Journal of Business* 53:143–158.

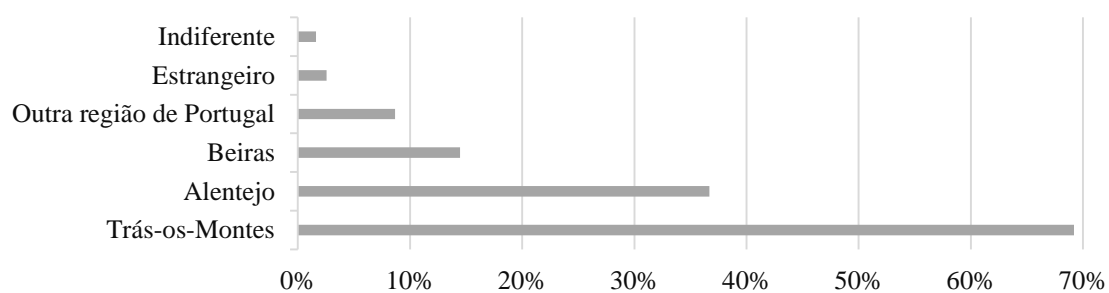
### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020) através de fundos nacionais FCT/MCTES. Nuno Rodrigues agradece a "Fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito da celebração do contrato-programa de emprego científico institucional".

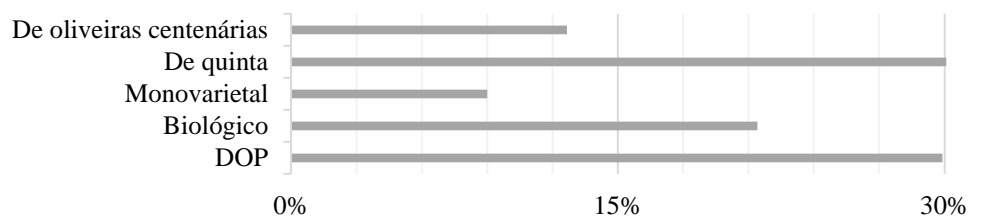
## Quadros e Figuras



**Figura 1** - Categoria comercial do azeite consumido (N=1177).

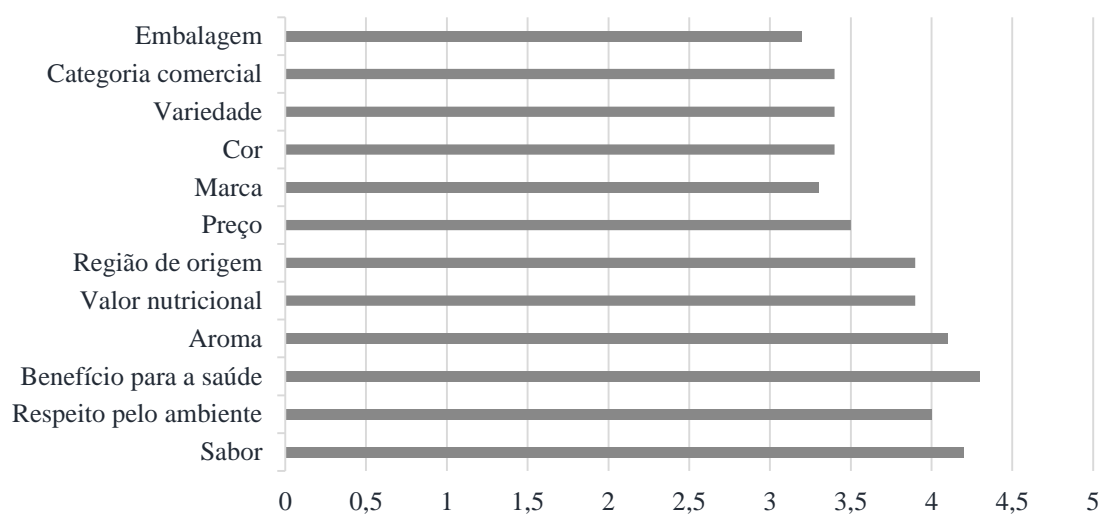


**Figura 2** - Origem do azeite consumido (N=1177).



**Figura 3** - Preferências por produções diferenciadas no consumo de azeite (N = 1177).





**Figura 4** - Atributos mais valorizados na compra/consumo de azeite (escala de 1 a 5, em que 1 é nada importante e 5 é muito importante).

## Perfil enzimático de leveduras isoladas durante o processamento de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo

Tatiane Oliveira<sup>1,2</sup>, Eliane Colla<sup>1</sup>, P. Baptista<sup>2</sup>, José A. Pereira<sup>2</sup> e Ermelinda L. Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira, 85884-000 Medianeira- Paraná, Brasil, taticgoliveira@outlook.com; ecolla@utfpr.edu.br;

<sup>2</sup> Centro de Investigação de Montanha (CIMO) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de St<sup>a</sup> Apolónia, 5301-855 Bragança, Portugal.

### Resumo

No presente trabalho, avaliou-se o perfil enzimático de leveduras isoladas durante o processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cultivar Negrinha de Freixo, a mais importante da região do Nordeste de Portugal. Foram testados onze isolados de leveduras, pertencentes aos géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Galactomyces*, através de métodos qualitativos, para a produção de lipase, protease, amilase, xilanase, catalase e  $\beta$ -glucosidase.

A atividade da catalase foi observada em todas as espécies isoladas (*C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. norvegica*, *D. hansenii*, *R. graminis*, *C. boidinii*, *P. guilliermondii*, *R. glutinis*, *P. manshurica* e *G. reessii*). A atividade da amilase foi observada apenas em *G. reessii*. Todas as espécies testadas apresentaram reduzida ou nula atividade para as enzimas xilanase e protease. *R. graminis*, *R. glutinis* e *G. reessii* apresentaram elevada atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase e *S. cerevisiae* e *P. manshurica* elevada atividade da enzima lipase. Os resultados obtidos demonstram o potencial de uso de algumas leveduras para fins biotecnológicos, designadamente como culturas *starters* durante o processamento de azeitona de mesa.

**Palavras-chave:** Lipase, protease, amilase, xilanase, catalase,  $\beta$ -glucosidase

### Abstract

The aim of this study was evaluated the enzymatic profile of yeasts isolated during the natural fermentation process of table olives *Negrinha de Freixo* cultivar, the most important of the Northeast region of Portugal. Eleven isolated yeast strains belonging to the genus *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* and *Galactomyces* were tested through qualitative methods for the production of lipase, protease, amylase, xylanase, catalase and  $\beta$ -glucosidase.

The catalase activity was observed in all isolated strains (*C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. norvegica*, *D. hansenii*, *R. graminis*, *C. boidinii*, *P. guilliermondii*, *R. glutinis*, *P. manshurica* and *G. reessii*). Amylase activity was observed only in *G. reessii*. All species tested showed slight or none activity for xylanase and protease enzymes. *R. graminis*, *R. glutinis* and *G. Reessi* showed high activity of  $\beta$ -glucosidase and *S. cerevisiae* and *P. manshurica* showed high lipase activity. The results demonstrate the potential use of some yeast for biotechnological purposes, such as starter cultures for the table olive processing.

**Keywords:** lipase, protease, amylase, xylanase, catalase,  $\beta$ -glucosidase

## Introdução

As leveduras são fungos unicelulares eucariontes amplamente utilizadas para fins biotecnológicos, designadamente na produção de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, enzimas industriais e outros produtos. Várias espécies estão envolvidas na fermentação espontânea de vários produtos alimentares fermentados (Moslehi-jenabian, Pedersen, & Jespersen, 2010). Por exemplo, no processamento da azeitona fermentada as leveduras estão associadas com a produção de uma ampla variedade de compostos que influenciam a textura e o desenvolvimento de aromas típicos das azeitonas de mesa (Arroyo et al. 2008).

Nos últimos anos diversos trabalhos têm enfatizado a importância de selecionar leveduras de produtos fermentados para serem usadas para fins biotecnológicos, designadamente como culturas *starter* ou probióticas em vários produtos alimentares (Gil-Rodríguez et al., 2015; Bonatsou et al., 2015; Syal e Vohra 2013; Bautista-Gallego et al., 2011; Sourabl et al. 2011; Silva et al. 2011). Assim, de forma a selecionar as leveduras com melhor desempenho, são realizados testes para avaliar a atividade enzimática, a atividade antimicrobiana, a produção de enzimas do complexo B, a tolerância aos sais e ao pH, entre outros ensaios.

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu avaliar a capacidade de produção de enzimas de interesse tecnológico por leveduras isoladas durante o processo de fermentação natural de azeitonas de mesa da cv. Negrinha de Freixo. Esta azeitona é um produto da região de Trás-os-Montes com denominação de origem protegida (DOP).

## Material e Métodos

Um total de 11 espécies de leveduras, previamente identificadas por Pereira et al. (2015), representativas da flora microbiana presente durante o processo de fermentação da azeitona de mesa da cv. Negrinha de Freixo foram testadas quanto à produção das enzimas lipase, protease, amilase, xilanase, catalase e  $\beta$ -glucosidase através de testes qualitativos.

As leveduras isoladas, na polpa da azeitona imediatamente antes do processo fermentativo, na polpa da azeitona em contacto com a salmoura e na salmoura pertencem aos géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Galactomyces*.

Para a pesquisa da enzima catalase utilizou-se o método descrito por Whittenbury (1964), utilizando-se o peróxido de hidrogénio 3% (v/v). A atividade da catalase foi observada através do aparecimento rápido de bolhas de gás. A atividade da protease foi determinada a partir do método descrito por Strauss et al. (2001), através do espalhamento do inoculo em placas com meio *Potato dextrose agar* (PDA) contendo 20 g/L de caseína. Após um período de incubação de 5 dias a 30° C considerou-se positivo a formação de uma zona clara em torno da colónia. Os ensaios para avaliar a atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase foram realizados de acordo com o método descrito por Bautista-Gallego et al. (2011), usando arbutina como substrato. O meio basal consistia de 6,7 g/L *Yeast Nitrogen Base* (YNB, Difco), suplementado com 5 g/L de arbutina e 20 g/L de agar, ajustado o meio para pH 5,0 com 0,1 N de HCl. Após esterilização do meio adicionou-se por 100 mL de meio 2 mL de solução de citrato férrico amoniacal a 1% (p/v). As leveduras foram inoculadas em estrias radiais e incubadas a 25°C durante 8 dias. As estirpes capazes de hidrolisar o substrato apresentaram uma cor castanho escura à volta das colónias. A atividade da lipase foi realizada a partir do método descrito por Samad et al. (1989), com poucas alterações. O meio *Yeast Extract Agar* (YEA), suplementado com tween 80 (1%) e vermelho de fenol (0,01%), foi ajustado para pH 7,3–7,4 utilizando 1N NaOH. As placas

foram inoculadas com as leveduras e incubadas a 37° C por 48 horas. O resultado foi observado a partir da mudança de cor do meio. A atividade da amilase foi realizada utilizando o meio agar de amido constituído por peptona (10 g/L), extracto de levedura (5 g/L), NaCl (5 g/L), amido (2 g/L) e agar (15 g/L). O pH deste meio foi ajustado para 6,8±0,2 com 0,1 N HCl. Após inoculação das leveduras as placas foram incubadas a 30° C durante 5 dias. Ao fim desse período, adicionou-se às culturas uma solução de lugol tendo-se considerado reação enzimática positiva a formação de um halo de cor castanha em torno das colónias. Para analisar a capacidade das leveduras produzirem a enzima xilanase, seguiu-se o método descrito por Hernández et al. (2007). Para o efeito, utilizou-se o meio YEA suplementado com xilano (5 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L) e NaCl (5 g/L). Após sementeira do meio as placas foram incubadas a 25° C durante 10 dias. A presença da enzima xilanase foi observada pelo aparecimento de um halo claro ao redor das colónias.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado para cada um dos isolados e os resultados expressos de forma qualitativa, onde “-” atividade nula; “+” atividade fraca; “++” atividade moderada e “+++” atividade forte. Para a pesquisa da catalase os resultados foram expressos em termos de presença “P” ou ausência “0”.

### Resultados e Discussão

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da atividade enzimática apresentado por cada isolado testado.

Todas as estirpes avaliadas apresentaram atividade da enzima catalase. Resultados semelhantes também foram observados por Nogueira et al. (2012), Bautista-Gallego et al. (2011) e Hernández et al. (2007) na maioria das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona. Esta enzima tem a capacidade de reduzir a oxidação de ácidos gordos insaturados e a formação de peróxido de hidrogénio contribuindo para a preservação das azeitonas (Hernández et al., 2007).

Os resultados relacionados com a produção da enzima lipase mostraram que todos os isolados testados, à exceção da *G. reessii*, foram capazes de hidrolisar os trigliceróis presentes, podendo-se destacar com forte produção as estirpes *P. manshurica* e *S. cerevisiae*. Porém, Rodríguez-Gómez et al. (2010) não observaram nenhuma atividade desta enzima em *S. cerevisiae* isolada em azeitonas pretas. De acordo com estes autores, esta atividade é desejável em leveduras fermentativas porque pode melhorar o sabor da azeitona através da formação de compostos voláteis produzidos pelo catabolismo dos ácidos gordos livres.

A atividade da protease, detetada pela formação de um halo claro ao redor das colónias de leveduras, foi fraca em *C. tropicalis*, *C. norvegica*, *C. boidinii*, *S. cerevisiae*, *R. graminis*, *R. glutinis*, *P. membranifaciens* e *D. hansenii*, verificando-se nessas espécies um pequeno halo quase imperceptível. A ausência de halo foi observada em *P. manshurica*, *G. reessii* e *P. guilliermondii*. Atividade forte desta enzima foi mencionada por Bautista-Gallego et al. (2011) em *P. galeiformis* isolada de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas. Esta enzima tem várias aplicações em diferentes indústrias. Tem a capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas levando à formação de grupos amina (NH<sub>2</sub>) e carboxila (COOH), originando polipeptídeos de menor peso molecular e/ou aminoácidos livres.

Os isolados que apresentaram atividade da enzima β-glucosidase foram identificados através do aparecimento de uma coloração castanha escura ao redor das colónias no meio de cultura com arbutina. *R. glutinis*, *R. graminis* e *G. reessii* apresentaram forte atividade desta enzima, enquanto que *C. norvegica* e *P. guilliermondii* apresentaram

moderada atividade. Atividade nula desta enzima foi observada em *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *C. boidinii* e *P. manshurica* (Tabela 1). Nogueira et al (2012) referem igualmente nula produção desta enzima para as leveduras *C. boidinii* e *P. manshurica* isoladas no final da fermentação da azeitona da cv. Cobrançosa. Esta enzima tem a capacidade de clivar as ligações  $\beta$ -glucosídicas em diversos substratos. No processo de fermentação da azeitona está envolvida na biodegradação dos polifenóis presentes no fruto da azeitona, causando a diminuição do teor de oleuropeína, composto que provoca o amargor do fruto, melhorando assim as características sensoriais no produto final (Arroyo-lópez et al., 2012).

Em relação à atividade da amilase, apenas a *G. reessii* mostrou fraca atividade e as restantes espécies apresentaram atividade nula. Esta enzima apresenta grande importância em biotecnologia com principal aplicação na indústria alimentícia (Spier et al., 2006).

Relativamente à xilanase, as estirpes *D. hansenii* e *P. manshurica* mostraram nula atividade enquanto que as restantes exibiram fraca atividade. Bautista-Gallego et al (2011) não observaram atividade desta enzima em leveduras isoladas de azeitonas verdes de diferentes cultivares espanholas. Esta enzima tem sido associada ao amolecimento dos frutos da azeitona sendo este aspeto indesejável durante o processo de fermentação da azeitona (Hernández et al., 2007).

## Conclusões

Os resultados obtidos demonstram o potencial uso das espécies *R. graminis*, *R. glutinis* e *G. reesi* como produtoras da enzima  $\beta$ -glucosidase e das espécies *P. manshurica* e *S. cerevisiae* como produtoras da enzima lipase. Contudo, serão necessários testes adicionais para melhor caracterizar estes isolados, de forma a possibilitar o seu uso como culturas *starter* no processo de fermentação de azeitonas de mesa, a fim de promover um produto final com melhores características nutricionais e tecnológicas, bem como com maior tempo de vida útil.

## Referências

- Arroyo-López, F. N.; Romero-Gil, V.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Jiménez-Díaz, R.; García-García, P.; Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms?. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 42-49.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A.; Bautista-Gallego, J. & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189-196.
- Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Barrio, E.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A.; Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 89-96.
- Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1156–1162.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24, 346–351.

- Moslehi-jenabian, S., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients*, 2, 449–473.
- Nogueira, F., Mendes, P., Pereira, J.A., & Pereira, E. L. (2012). Atividade enzimática de leveduras isoladas na fase final de fermentação natural de azeitonas de mesa da região de Trás-os-Montes. In VI Simpósio Nacional de Olivicultura, Mirandela, 15 a 17 de novembro de 2012, Atas Portuguesas de Horticultura, nº 21, 315-321.
- Pereira, E.L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J.A., Baptista, P. (2015). Yeast dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiology*, 46, 582-586.
- Rodríguez-gómez, F., Arroyo-lópez, F. N., López-lópez, A., Bautista-gallego, J., & Garrido-fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation / storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604–612.
- Samad, M. Y., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. M. Zin Wan, Ampon, K., & Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9(1), 51-56.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1349-1354.
- Syal, P., & Vohra, A. (2013). Probiotic potencial of yeasts isolated from traditional indian fermented foods
- Spier, M. R., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2006). Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using Agro industrials Products. *International Journal of Food Engineering*, 2(3), Art 6.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Rensburg, P. Van. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non- *Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 182–190.
- Whittenbury, R. (1964). Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *Journal Gen. Microbiology*, 35, 13–26.

## Tabelas e Figuras

**Tabela 1** - Resultados médios da atividade enzimática das leveduras isoladas durante o processo de fermentação da azeitona da cv. Negrinha de Freixo.

Espécie	Substrato	Catalase	Lipase	Protease	Amilase	$\beta$ -Glucosidase	Xilanase
<i>C. tropicalis</i>	Polpa <sup>1</sup>	P	+	+	-	+	+
<i>P. membranifaciens</i>	Polpa <sup>1</sup>	P	+	+	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	Polpa <sup>1</sup>	P	+++	+	-	-	+
<i>C. norvegica</i>	Polpa <sup>2</sup>	P	+	+	-	++	+
<i>D. hansenii</i>	Polpa <sup>2</sup>	P	+	+	-	-	-
<i>R. graminis</i>	Polpa <sup>2</sup>	P	+	+	-	+++	+
<i>C. boidinii</i>	Polpa <sup>1</sup>	P	+	+	-	-	+
<i>P. guilliermondii</i>	Polpa <sup>2</sup>	P	+	-	-	++	+
<i>R. glutinis</i>	Polpa <sup>2</sup>	P	+	+	-	+++	+
<i>P. manshurica</i>	Salmoura	P	+++	-	-	-	-
<i>G. reessii</i>	Salmoura	P	-	-	+	+++	+

Legenda: “P” presença; “-” nenhuma atividade; “+” fraca atividade; “++” moderada atividade, “+++” forte atividade; <sup>1</sup> Polpa da azeitona em contato com a salmoura; <sup>2</sup> Polpa da azeitona antes de ser imersa na salmoura.

## Patrocinador Platina



**MAGOS**  
Irrigation Systems

**syngenta®**



## Patrocinador Ouro

**BASF**  
We create chemistry

**Lusosem®**  
produtos para agricultura, S.A.



**yunit<sup>n</sup>** // Consulting

## Patrocinador Prata



## Patrocinador Bronze

**agrogarante**  
SOCIEDADE DE GARANTIA MUTUA

**garantia mutua**  
CRESCER CONNOSCO

**SAPEC**  
AGRO PORTUGAL

**TECNIFERTI**