



NELSON MIGUEL VAZ PEREIRA  
Licenciado em Bioquímica

# VALORIZAÇÃO ALIMENTAR DE FRUTOS DE TOMATE-INDÚSTRIA NÃO AMADURECIDO

ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO COM UTILIZAÇÃO DE  
*STARTERS* DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Dezembro, 2021



# VALORIZAÇÃO ALIMENTAR DE FRUTOS DE TOMATE-INDÚSTRIA NÃO AMADURECIDO

ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO COM UTILIZAÇÃO DE *STARTERS* DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO

## NELSON MIGUEL VAZ PEREIRA

Licenciado em Bioquímica

**Orientadora:** Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu,  
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Unidade de Tecnologia e Inovação

**Co-orientadora:** Doutora Elsa Margarida Gonçalves,  
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Unidade de Tecnologia e Inovação

### Júri

**Presidente:** Professora Doutora Sofia Rocha Pauleta  
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Universidade NOVA de Lisboa

**Arguente:** Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins  
Professora Associada com Agregação, Instituto Superior de Agronomia

**Orientadora:** Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu  
Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Unidade de Tecnologia e Inovação

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Dezembro, 2021





2021

NELSON PEREIRA

VALORIZAÇÃO ALIMENTAR DE FRUTOS DE TOMATE-INDÚSTRIA NÃO AMADURECIDO

**Valorização alimentar de frutos de tomate-indústria não amadurecido. Estudos de fermentação com utilização de *starters* de bactérias do ácido láctico.**

Copyright © Nelson Miguel Vaz Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



# AGRADECIMENTOS

Dedico esta secção a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, deste meu percurso:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, em particular à Unidade de Tecnologia e Inovação, pela oportunidade e confiança de integrar uma equipa fantástica e participar num projeto tão interessante e relevante.

Com todo o carinho e estima, manifesto o meu sincero agradecimento à minha orientadora, a Doutora Marta Abreu, pela sua imensa paciência, acompanhamento, orientação, disponibilidade constante, dedicação, sentido crítico, simpatia, motivação, alegria e conselhos indispensáveis ao longo de todo este percurso. Da mesma forma, agradeço à Doutora Elsa Gonçalves, enquanto coorientadora deste trabalho, pela partilha de conhecimentos, esclarecimento de dúvidas, preocupação, disponibilidade, simpatia e, principalmente, pelo convite para embarcar nesta aventura.

Agradeço todo o apoio prestado pela equipa da Unidade de Microbiologia da UTI-INIAV, com particular destaque para a Doutora Cristina Aleixo e para a Doutora Maria Paula Martins, pelos seus ensinamentos, colaboração, simpatia, boa disposição e motivação prestados durante a minha estadia. Quero agradecer também à Doutora Cristina Ramos e à Doutora Carla Alegria por todo o apoio, colaboração, simpatia, alegria e ensinamentos. Às minhas colegas de laboratório, Isa, Luísa e Leopoldina, o meu muito obrigado pelos bons momentos, entusiasmo, incentivo, partilha de conhecimentos, companheirismo, alegria e animação.

Não posso deixar de agradecer à Professora Sofia Pauleta, enquanto elo de ligação da FCT, por toda a preocupação, atenção e apoio prestado, assim como a sua imediata disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas. Enquanto coordenador do mestrado, deixo umas palavras de agradecimento ao Professor Ricardo Franco pela sua simpatia, ajuda, motivação e opiniões durante estes 2 últimos anos.

Quero deixar ainda um agradecimento ao Centro Competências Tomate Indústria, na pessoa do Dr. João Santos Silva, pelo fornecimento da matéria-prima e ao laboratório StabVida pela colaboração e realização da identificação molecular das estirpes bacterianas.

Por fim, o mais especial: agradeço do fundo do coração à minha família, sobretudo aos meus pais e irmã, por toda a paciência, motivação, incentivo, compreensão, carinho, por acreditarem sempre em mim e por todo o amor incondicional, não só durante esta etapa, mas desde sempre. Nada disto seria possível sem todo o vosso apoio. A todos os meus amigos, os de longa data e os da licenciatura/mestrado, o meu muito obrigado por todo o companheirismo, alegria, carinho, partilha e aventuras. Sem dúvida deram-me forças para continuar.

Aos citados e a todos os que não foram mencionados, mas nunca esquecidos,

**Muito Obrigado!**



## RESUMO

A fermentação láctica de tomate-indústria não amadurecido (TV) configura uma alternativa tecnológica para a valorização de frutos descartados em grandes quantidades no campo e cujo aproveitamento é nulo. Por outro lado, assiste-se ao crescente interesse na investigação de ingredientes/alimentos fermentados de origem vegetal de elevada bioatividade, entre outras propriedades biológicas e funcionais com reconhecido impacto na saúde humana. Com o objetivo de selecionar estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) como potenciais culturas *starters* na fermentação de TV, procedeu-se ao isolamento, caracterização e identificação da microbiota láctica do TV, bem como de estirpes da coleção do INIAV aptas para a fermentação desta matriz. Os géneros predominantes na microbiota do fruto foram identificados como *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (identificação bioquímica e molecular). Estirpes de BAL selecionadas (duas alóctones e sete autóctones) foram testadas quanto à sobrevivência em condições do trato gastrointestinal humano, simuladas *in vitro* (pH 2,5 e sais biliares), e face à adição de solanina (200 ppm). Apenas as espécies *Weissella paramesenteroides* alóctone e *Lactiplantibacillus plantarum* autóctone exibiram potencial probiótico *in vitro*. Todas as estirpes revelaram tolerância à presença de solanina. A fermentação controlada de TV, independentemente da estirpe inoculada e da adição de NaCl (2,5%), revelou-se sempre vantajosa face à fermentação natural (espontânea) porquanto acelerou o processo fermentativo e promoveu o desenvolvimento consistente de perfis sensoriais aceitáveis. A utilização das estirpes selecionadas *Weissella paramesenteroides* e *Lactiplantibacillus plantarum* como *starters* (*per se*) produziu fermentados com potencialidades probióticas (contagens > 7 log UFC/mL ao final de 14 dias) e sensorialmente aceites (aroma, aparência e sabor). A qualidade sensorial, a composição antioxidante (ácidos fenólicos e flavonoides) e a perspetiva de carácter probiótico validam esta estratégia na obtenção de um ingrediente base com vista à formulação de alimentos funcionais (molhos e temperos).

**Palavras-chave:** tomate-indústria não amadurecido; fermentação láctica; bactérias do ácido láctico; potencial probiótico; *Weissella paramesenteroides*; *Lactiplantibacillus plantarum*.



# ABSTRACT

The lactic fermentation of unripe green tomato (TV) is a technological alternative to add value to these unused low-valued fruits left in large quantities in the fields. Besides, there is a growing interest in fermented products of vegetal origin, mainly due to their high bioactivity, among other important biological and functional properties. To select lactic acid bacteria (LAB) strains as potential starters in the fermentation process, strains from TV lactic flora and the INIAV bacterial collection were isolated and characterized. Biochemical and molecular identification identified the predominant LAB genera in TV microbiota as *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, and *Weissella*. Selected LAB strains (two allochthonous and seven autochthonous) were tested for survival in human gastrointestinal tract conditions (pH 2.5 and bile salts, simulated *in vitro*) and tolerance to threshold concentrations of solanine (200 ppm). Only allochthonous *Weissella paramesenteroides* and autochthonous *Lactiplantibacillus plantarum* exhibited probiotic potential *in vitro*. All strains showed tolerance to added solanine. Controlled TV fermentation, regardless of the inoculated strain and the addition of NaCl (2.5%), was always advantageous over natural (spontaneous) fermentation as it improved the process efficiency and promoted the development of acceptable sensory profiles. The use of the selected strains (*Weissella paramesenteroides* and *Lactiplantibacillus plantarum*), as starters *per se*, produced sensorially accepted fermented products with probiotic potential (counts > 7 log CFU/mL at the end of 14 days). The sensory quality, antioxidant composition (phenolic acids and flavonoids), and probiotic potential forecast validate this strategy in obtaining a base ingredient for the formulation of functional foods (sauces and dressings).

**Keywords:** unripe green tomato; lactic fermentation; lactic acid bacteria; probiotic potential; *Weissella paramesenteroides*; *Lactiplantibacillus plantarum*.



# ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE DE MATÉRIAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABELAS .....	XV
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	XIX
<b>I. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>1</b>
1. <i>Desperdício Alimentar</i> .....	1
2. <i>Tomate – Origem, produção e consumo</i> .....	2
2.1. Composição nutricional e físico-química durante a maturação.....	3
3. <i>Fermentação láctica</i> .....	5
3.1. Bactérias do ácido láctico (BAL).....	6
3.2. Modos de iniciação .....	7
3.3. Fatores que influenciam o processo fermentativo.....	11
4. <i>Produtos fermentados como fonte de probióticos</i> .....	12
4.1. Critérios probióticos.....	13
4.2. Benefícios de fermentados vegetais com características probióticas.....	13
5. <i>Objetivos</i> .....	14
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
6. <i>Procedimentos de preparação das amostras</i> .....	15
6.1. Receção da matéria-prima.....	15
6.2. Processamento em polpa .....	15
7. <i>Procedimentos microbiológicos</i> .....	17
7.1. Condições de cultura das estirpes bacterianas .....	17
7.2. Contagens microbiológicas .....	17

7.3.	Isolamento das estirpes de BAL autóctones.....	18
7.4.	Congelamento e ativação de estirpes puras de BAL.....	18
7.5.	Caracterização e identificação das estirpes autóctones.....	18
8.	<i>Determinações físico-químicas e avaliação sensorial</i> .....	21
8.1.	Teor de humidade.....	21
8.2.	pH.....	21
8.3.	Teor de sólidos solúveis (TSS).....	21
8.4.	Acidez titulável (AT).....	22
8.5.	Preparação de extratos metanólicos.....	22
8.6.	Conteúdo fenólico total (CFT).....	22
8.7.	Atividade antioxidante (AOx).....	23
8.8.	Parâmetros colorimétricos CIELab.....	23
8.9.	Perfil fenólico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	25
8.10.	Painel Sensorial.....	25
9.	<i>Análise Estatística</i> .....	26
<b>III.</b>	<b>TRABALHO EXPERIMENTAL – DELINEAMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
10.	<i>Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL</i> .....	27
10.1.	Parâmetros físico-químicos e grupos microbianos.....	27
10.2.	Caracterização e identificação molecular da microbiota láctica.....	33
10.3.	Potencial probiótico <i>in vitro</i> .....	39
10.4.	Tolerância à adição de solanina.....	43
11.	<i>Ensaio de fermentação em tomate-indústria não amadurecido</i> .....	45
11.1.	Fermentação espontânea.....	45
11.2.	Fermentação controlada (5 estirpes de BAL autóctones).....	51
11.3.	Fermentação controlada (2 estirpes de BAL autóctones) e efeito da adição de NaCl.....	61
11.4.	Fermentação controlada (2 estirpes de BAL com potencial probiótico <i>in vitro</i> ).....	71
<b>IV.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>79</b>
12.	<i>Conclusões gerais</i> .....	79
13.	<i>Divulgação</i> .....	80
14.	<i>Perspetivas futuras</i> .....	80
<b>V.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>83</b>
<b>VI.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>   Ilustração das diferentes fases de maturação do tomate. ....	3
<b>Figura 2.2</b>   Alterações composicionais no tomate durante a maturação. ....	4
<b>Figura 3.1</b>   Fases do crescimento bacteriano.....	6
<b>Figura 3.2</b>   Reações de fermentação láctica das (A) BAL homofermentativas e das (B) BAL heterofermentativas. ....	7
<b>Figura 3.3</b>   Representação esquemática da abordagem polifásica necessária para a seleção de CS. ....	11
<b>Figura 4.1</b>   Características probióticas de seleção das estirpes bacterianas. ....	13
<b>Figura 6.1</b>   Categorias do TV: verde (à esquerda) e intermédia (à direita).....	15
<b>Figura 6.2</b>   Esquema de operações para a preparação de polpas. ....	16
<b>Figura 6.3</b>   Aspeto dos homogeneizados de tomate. ....	16
<b>Figura 7.1</b>   Galerias API 50 CH. ....	20
<b>Figura 7.2</b>   Representação esquemática do gene 16S rDNA bacteriano e da localização dos <i>primers</i> de sequenciação. ....	21
<b>Figura 8.1</b>   Modelo do sistema espacial de cromaticidade CIELab, com ilustração das coordenadas L*, a* e b*, assim como os parâmetros C* e °h. ....	24
<b>Figura III.1</b>   Planificação geral dos ensaios. ....	27
<b>Figura 10.1</b>   Cromatogramas de HPLC-DAD para as amostras “Verde”, “Intermédio” e “Mistura” a (a) $\lambda = 280$ nm e (b) $\lambda = 340$ nm.....	30
<b>Figura 10.2</b>   Contagens médias dos grupos microbiológicos: microrganismos a 30 °C, BAL, B&L, coliformes, <i>Staphylococcus coagulase positivas</i> e <i>E. Coli</i> , para a amostra “Mistura” de frutos. ....	31
<b>Figura 10.3</b>   Predominância das diferentes espécies de BAL isoladas da microbiota do TV.....	36
<b>Figura 10.4</b>   Contagens de BAL (log UFC/mL) em meio MRS com e sem adição de 200 ppm de solanina, durante 72 h de incubação.....	44
<b>Figura 11.1</b>   Variação nas contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV com (Esp_CTT) e sem (Esp_STT) aplicação de TT, durante 14 dias.....	46
<b>Figura 11.2</b>   Variação nas contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV com (Esp_CTT) e sem (Esp_STT) aplicação de TT, durante 14 dias.....	46
<b>Figura 11.3</b>   Variação de (A) pH, (B) AT (g AL/100 g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de tomate com (Esp_CTT) e sem (Esp_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. ....	47
<b>Figura 11.4</b>   Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOX ( $\mu$ mol ET/100g PF) de amostras de polpa de TV com (Esp_CTT) e sem (Esp_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. ....	48

<b>Figura 11.5</b>   Variação das contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. ....	52
<b>Figura 11.6</b>   Variação das contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. ....	53
<b>Figura 11.7</b>   Variação de (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. ....	54
<b>Figura 11.8</b>   Variação do CFT (mg EAG/100g PF) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. ....	56
<b>Figura 11.9</b>   Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro a*, (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170, C1090) e para as amostras não inoculadas (Esp_CTT, Esp_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. ....	57
<b>Figura 11.10</b>   Classificações médias atribuídas durante a avaliação sensorial da cor e do aroma de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170, C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT, Esp_STT, com e sem TT, respetivamente) ao 14º dia de armazenamento. ....	59
<b>Figura 11.11</b>   Variação nas contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S), durante 14 dias. ....	62
<b>Figura 11.12</b>   Variação nas contagens de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S), durante 14 dias. ....	63
<b>Figura 11.13</b>   Variação da (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S), durante 14 dias. ....	64
<b>Figura 11.14</b>   Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOx (µmol ET/100g PF) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S), durante 14 dias. ....	66
<b>Figura 11.15</b>   Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro a*, (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de	

polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e para as amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias.....68

**Figura 11.16** | Classificação média atribuída durante a avaliação sensorial da cor, consistência, aroma e apreciação global de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S) ao 14º dia de armazenamento. ....69

**Figura 11.17** | Variação das contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias.....71

**Figura 11.18** | Variação das contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias.....72

**Figura 11.19** | Variação da (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (ºBrix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. ....73

**Figura 11.20** | Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOx ( $\mu\text{mol ET}/100\text{g PF}$ ) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. ....74

**Figura 11.21** | Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro  $a^*$ , (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. ....76

**Figura 11.22** | Classificações médias atribuídas durante a avaliação sensorial da cor, aroma, sabor, consistência e apreciação global de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp) ao 14º dia de armazenamento. ....78

**Figura VI.1** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de ácido gálico na gama 0,004–0,600 mg/mL a  $\lambda = 725 \text{ nm}$  e utilizadas para a determinação do CFT durante a caracterização inicial do TV. ....95

**Figura VI.2** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de ácido gálico na gama 0,004–0,600 mg/mL a  $\lambda = 725 \text{ nm}$  e utilizadas para a determinação do CFT durante os ensaios fermentativos.....95

**Figura VI.3** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de Trolox na gama 82–1000  $\mu\text{M}$  a  $\lambda = 580 \text{ nm}$  e utilizadas para a determinação da AOx através do método de DPPH durante a caracterização inicial do TV.....95

<b>Figura VI.4</b>   Reta de calibração construída a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 $\mu\text{M}$ a $\lambda = 580$ nm e utilizada para a determinação da AOx através do método de DPPH durante a realização dos primeiros dois ensaios fermentativos (Ensaio 11.1 e 11.2). .....	96
<b>Figura VI.5</b>   Reta de calibração construída a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 $\mu\text{M}$ a $\lambda = 580$ nm e utilizada para a determinação da AOx através do método de DPPH durante a realização do terceiro ensaio fermentativo (Ensaio 11.3). .....	96
<b>Figura VI.6</b>   Reta de calibração construída a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 $\mu\text{M}$ a $\lambda = 580$ nm e utilizada para a determinação da AOx através do método de DPPH durante a realização do último ensaio fermentativo (Ensaio 11.4). .....	96
<b>Figura VI.7</b>   Ficha de prova utilizada para a avaliação sensorial das amostras fermentadas no ensaio 11.4. ....	97
<b>Figura VI.8</b>   (i) Eletroforese em gel de agarose (1,5 %, 120 V, 20 minutos) de 2 $\mu\text{L}$ dos produtos PCR. (ii) Marcadores de DNA (5 $\mu\text{L}$ ) utilizados na eletroforese. ....	102

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>   Propriedades de estirpes autóctones e alóctones usadas como CS no processo de fermentação.....	8
<b>Tabela 3.2</b>   Principais critérios (e características metabólicas correspondentes) considerados na seleção de CS para a fermentação de HF.....	9
<b>Tabela 8.1</b>   Classificação detalhada do nível de diferenças obtido através do DTC. ....	25
<b>Tabela 10.1</b>   Valores reportados na literatura para os parâmetros TSS, pH, AT, CFT e AOx, em TV (categoria verde). ....	28
<b>Tabela 10.2</b>   Graus de fiabilidade para as percentagens de identificação obtidas pelo método API (BioMérieux S.A, Marcy L'Etoile, França). ....	34
<b>Tabela 10.3</b>   Identificação sugerida pelo método API 50 CHL para as estirpes isoladas, com as respetivas percentagens de identificação e classificações. ....	34
<b>Tabela 10.4</b>   Conjunto de estirpes de BAL selecionadas. ....	36
<b>Tabela 10.5</b>   Espécies sugeridas pelas sequências consensus de cada estirpe depois de introduzidas na ferramenta BLAST e confrontadas com a base de dados de NCBI. ....	37
<b>Tabela 10.6</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) das contagens de BAL iniciais (t = 0) e ao fim dos tempos de incubação (t = 3 h para S1 e t = 4 h para S2) para todas as estirpes em meio MRS e em meio TV.....	40
<b>Tabela 11.1</b>   Identificação das 5 estirpes de BAL alóctones utilizadas no ensaio e dados literários que suportam a respetiva seleção. ....	51
<b>Tabela VI.1</b>   Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para cada grupo de amostras (verde, intermédio e mistura) durante a caracterização inicial da matéria-prima.....	97
<b>Tabela VI.2</b>   Caracterização das estirpes isoladas (observação microscópica e testes da catalase e KOH). ....	98
<b>Tabela VI.3</b>   Padrões fermentativos resultantes do método API 50 CHL para as 55 estirpes isoladas do TV.....	100
<b>Tabela VI.4</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) das contagens de BAL (log UFC/mL) de todas as estirpes testadas ao fim dos tempos em estudo (t = 0, 3 e 4 h) em meio MRS e em meio TV.....	102
<b>Tabela VI.5</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH, TSS, CFT e AOx de amostras de polpa de TV fermentadas espontaneamente com (Esp_CTT) e sem (Esp_STT) aplicação de TT ao longo de 14 dias. ....	103
<b>Tabela VI.6</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH e TSS de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente) ao longo de 14 dias. ....	103

<b>Tabela VI.7</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) do CFT de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp_CTT e Esp_STT, com e sem TT, respetivamente) ao longo de 14 dias.	104
<b>Tabela VI.8</b>   Correlações entre os parâmetros colorimétricos ( $a^*$ , $^{\circ}h$ , WI e DTC) e os parâmetros pH e AT para todas as amostras (Esp_STT, Esp_CTT, C244, C202, C170, C1170 e C1090).	105
<b>Tabela VI.9</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH e TSS de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S) ao longo de 14 dias.	105
<b>Tabela VI.10</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) do CFT e AOx de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244_S, C1090_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp_S) ao longo de 14 dias.	106
<b>Tabela VI.11</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) do TSS para diferentes concentrações de NaCl em 10 mL de água destilada.	107
<b>Tabela VI.12</b>   Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para os grupos de amostras inoculadas (C244, C244_S, C1090 e C1090_S) e de amostras controlo (Esp e Esp_S).	107
<b>Tabela VI.13</b>   Correlações entre os parâmetros colorimétricos ( $a^*$ , $^{\circ}h$ , WI e DTC) e os parâmetros pH e AT para todas as amostras (Esp, Esp_S, C244, C244_S, C1090 e C1090_S).	107
<b>Tabela VI.14</b>   Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH, TSS, CFT e AOx de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp) ao longo de 14 dias.	108
<b>Tabela VI.15</b>   Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para os grupos de amostras inoculadas (C1090 e BAL97) e de amostras controlo (Esp).	108
<b>Tabela VI.16</b>   Correlações entre os parâmetros colorimétricos ( $a^*$ , $^{\circ}h$ , WI e DTC) e os parâmetros pH e AT) para todas as amostras (Esp, C1090 e BAL97).	109

# ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 7.1</b>   Equação para contagem de BAL e outros grupos microbiológicos (log UFC/mL).....	17
<b>Equação 8.1</b>   Equação para a determinação do teor de humidade (%). .....	21
<b>Equação 8.2</b>   Equação para a determinação da AT (g AL/100 g PF). .....	22
<b>Equação 8.3</b>   Equação para a determinação do CFT (mg EAG/100 g PF). .....	23
<b>Equações 8.4</b>   Conjunto de equações para a determinação da AOx através do método DPPH ( $\mu\text{M ET}/100\text{ g PF}$ ).....	23
<b>Equações 8.5</b>   Conjunto de equações para a determinação do parâmetro $^{\circ}\text{h}$ . .....	24
<b>Equação 8.6</b>   Equação para determinação do parâmetro WI .....	24
<b>Equação 8.7</b>   Equação para a determinação do parâmetro DTC. ....	24



# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AL	Ácido láctico
AOx	Atividade antioxidante
API	Índice de Perfil analítico (do inglês, <i>Analytical Profile Index</i> )
AT	Acidez titulável
BAL	Bactérias do ácido láctico
B&L	Bolores e leveduras
C*	Saturação/Cromaticidade
cf.	Conforme descrito
CFT	Conteúdo fenólico total
CS	Culturas <i>starter</i>
cv.	Cultivar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTC	Diferença total de cor
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EPS	Exopolissacáridos
ET	Equivalentes de Trolox
°h	Tonalidade
HF	Hortofrutícolas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
PF	Produto fresco
PPO	Polifenol oxidase
SOD	Superóxido dismutase
TV	Tomate-indústria não amadurecido ou tomate verde
TSS	Teor de sólidos solúveis
TT	Tratamento térmico
UFC	Unidades formadoras de colônias
WI	Índice de escurecimento

# I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

Com vista a contextualizar o tema desta dissertação, cabe referir a relevância da valorização do tomate-indústria não amadurecido (TV). Em Portugal, a indústria do tomate está focada na obtenção de um único produto de elevado valor acrescentado – concentrado de tomate, na qual são laborados, apenas, frutos em completo estado de maturação. Consequentemente, são descartados, logo ao nível do campo, quantidades elevadas de tomate não-amadurecido. Estes frutos são rejeitados pela indústria por falta de cumprimento dos requisitos de qualidade exigidos, nomeadamente grau insuficiente de teor de sólidos solúveis e ausência da cor vermelha desejada. O desenvolvimento de estratégias com vista à utilização destes frutos sem qualquer valor na atualidade, representa, assim, uma grande oportunidade no âmbito da diminuição do desperdício alimentar e no contexto da bioeconomia circular.

Os produtos fermentados reúnem um conjunto de características apelativas a nível sensorial (sabor, aroma e textura), são considerados alimentos seguros e com tempo prolongado de conservação. Estes benefícios são muito competitivos no mercado alimentar atual, aos quais se podem somar vantagens para além da componente nutricional e bioativa, designadamente o seu potencial probiótico. A crescente intolerância à lactose e as restrições à presença de colesterol nos produtos lácteos fermentados abrem uma janela de oportunidades para o desenvolvimento de produtos fermentados não lácteos. De facto, o desenvolvimento de novos produtos e/ou de ingredientes alimentares através de processos fermentativos de matrizes de origem vegetal (e sem adição de conservantes) tem sido amplamente investigado como uma estratégia viável para a diminuição do desperdício alimentar<sup>1</sup>.

Nos processos fermentativos, a utilização de culturas puras de microrganismos iniciadoras (*starters*) introduz muitas vantagens face à fermentação natural (espontânea), nomeadamente na rapidez de acidificação do meio e na garantia de reprodutibilidade do processo. Neste sentido, é importante selecionar *starters* adaptados à matriz vegetal, de preferência oriundos da própria microbiota. A seleção de bactérias do ácido láctico deve atender ainda à pesquisa de outras funcionalidades (como o potencial probiótico) ou de características específicas dos microrganismos, tais como a capacidade de desenvolvimento na presença de glicoalcaloides (por exemplo, a tomatina), cujos teores se preveem elevados no TV.

## 1. Desperdício Alimentar

---

O desperdício alimentar é um problema mundial e uma prioridade pública, dada a necessidade de alimentar uma população em crescimento. A ineficiência na gestão de géneros alimentícios tem importantes consequências económicas, sociais e ambientais, levando não só ao desperdício alimentar, como também a um desperdício de recursos utilizados no cultivo (solo, água, energia) e nas fases posteriores de processamento, empacotamento, transporte e comercialização dos produtos alimentares<sup>2</sup>. Segundo as previsões da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) em 2011, desperdiça-se anualmente cerca de um terço da produção mundial (ca. 1,3 mil milhões de toneladas)<sup>3</sup>. A nível nacional, em 2012, foi

## Introdução Teórica

estimado um desperdício alimentar anual de ca. 1 milhão de toneladas ( $\approx 17\%$  da produção anual)<sup>2</sup>.

O desperdício alimentar ocorre em todas as fases da cadeia de abastecimento alimentar, incluindo as etapas de produção agrícola, transformação, distribuição, retalho e consumo (nos restaurantes, estabelecimentos comerciais e domicílios), e é dependente do desenvolvimento económico de cada país. Nos países em desenvolvimento, estima-se que a maioria das perdas ( $> 40\%$ ) decorram durante o período de pós-colheita e processamento, enquanto nos países desenvolvidos, o desperdício alimentar ( $> 40\%$ ) concentra-se nas fases finais de retalho ou de consumo<sup>2,3</sup>. No que respeita ao setor dos hortofrutícolas (HF), estima-se que as perdas globais anuais ascendam a ca. 40–50% e são atribuídas, frequentemente, ao incumprimento dos padrões de qualidade estabelecidos<sup>3,4</sup>. Por estas razões, têm surgido inúmeras iniciativas mundiais e nacionais com o objetivo comum de reduzir o desperdício alimentar ao longo da cadeia de abastecimento através da implementação de um conjunto de medidas e estratégias de gestão sustentáveis<sup>5,6</sup>.

## 2. Tomate – Origem, produção e consumo

---

O tomate, fruto do tomateiro (*Solanum Lycopersicum L.*), é um dos frutos mais produzidos e consumidos mundialmente. Teve origem na América do Sul<sup>7</sup> e, desde então, tem sido utilizado na gastronomia, podendo ser consumido fresco ( $\approx 40\%$ ) ou processado industrialmente sob a forma de sumos, pastas, molhos, entre outros ( $\approx 60\%$ )<sup>8</sup>.

Segundo os dados estatísticos mais recentes, publicados pela FAO (ano 2019), a produção mundial de tomate foi estimada em ca. 181 milhões de toneladas/ano, com especial foco no continente asiático, que detém 62% do cultivo deste fruto, seguido da América (13,2%), Europa (12,6%) e África (12%)<sup>9</sup>. Na Europa, estimou-se uma produção anual de tomate de ca. 23 milhões de toneladas, com Itália, Espanha e Portugal a destacarem-se como os maiores produtores (ca. 5,3, 5 e 1,5 milhões de toneladas produzidas, respetivamente)<sup>9,10</sup>.

Em Portugal, a indústria do tomate está focada na obtenção de um único produto de elevado valor acrescentado – concentrado de tomate, e apenas os frutos em completo estado de maturação (com coloração totalmente vermelha) são laborados para este fim. Consequentemente, o tomate não amadurecido é normalmente deixado nos campos ou enviado para aterros, traduzindo perdas económicas para os produtores e com impacto ambiental negativo<sup>11</sup>. Ao nível do campo, foi estimado um nível de perdas anuais de ca.  $1,12 \times 10^8$  kg de tomate-indústria não amadurecido (TV)<sup>12</sup>. A esta fração desperdiçada, soma-se ainda uma grande quantidade de frutos rejeitados pela indústria no momento da receção da matéria-prima, devido à sua cor, forma, fase de maturação e lesões inaceitáveis<sup>11</sup>. Portanto, será importante recolher, descrever e analisar as perdas de frutos gerados na cadeia de valor do tomate<sup>13</sup> e desenvolver estratégias com vista a melhorar a sustentabilidade económica desta cultura. As principais abordagens adotadas para a valorização dos subprodutos de tomate incluem a

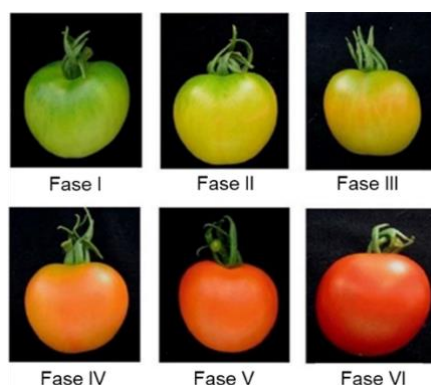
## Introdução Teórica

alimentação animal, o desenvolvimento de ingredientes funcionais para produtos alimentares e o aproveitamento da matéria-prima para nutracêuticos<sup>14</sup>.

### 2.1. Composição nutricional e físico-química durante a maturação

O tomate é um HF muito importante porque fornece uma proporção equilibrada de nutrientes vitais, tais como minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares, carotenoides, polifenóis e fibras dietéticas<sup>8,15,16</sup>. Em geral, os frutos contêm ca. 90–95% de água e 5–10% de matéria seca, sendo esta constituída, maioritariamente, por açúcares (50%) e ácidos orgânicos e aminoácidos (15%)<sup>17</sup>. Na composição do tomate, salienta-se ainda a presença de compostos como o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenoides (entre eles, o licopeno) e os polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides)<sup>18</sup>. Devido, em grande parte, ao seu carácter antioxidante, estes compostos desempenham funções importantes no nosso organismo (entre elas, a eliminação de radicais livres prejudiciais), sendo reconhecidos como promotores da saúde, nomeadamente na prevenção do desenvolvimento de doenças degenerativas<sup>16,19</sup> e de patologias crónicas e cardiovasculares<sup>8</sup>.

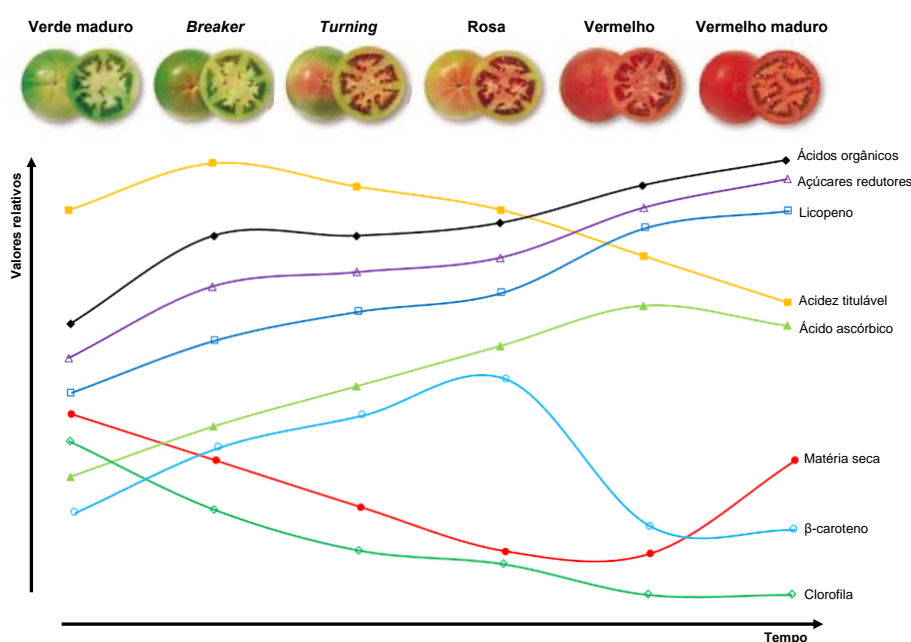
Para perspetivar possíveis vias de valorização de frutos não amadurecidos e/ou de frutos não conformes de tomate, é importante assinalar que a composição química do fruto depende de diversos fatores, entre os quais a variedade/tipo de cultivar (*cv.*), o estado de maturação à colheita, as condições edafoclimáticas (temperatura, estação do ano, fertilidade do solo) e as práticas de cultivo<sup>20,21</sup>. No entanto, a variedade e a fase de maturação à colheita são considerados os fatores principais que influenciam o valor nutricional do tomate e os seus atributos de qualidade<sup>22</sup>, nomeadamente a acidez titulável, o teor de sólidos solúveis, a cor, a firmeza, o sabor e o aroma<sup>19</sup>. As variações na composição do tomate também estão intimamente relacionadas com a cor à superfície, indicativa da fase de maturação do fruto. Assim, a cor da epiderme altera-se ao longo das diferentes fases de maturação (verde maduro, *breaker*, *turning*, rosa, vermelho e vermelho maduro), passando por diferentes tonalidades, de verde e amarelo até ao vermelho (Figura 2.1)<sup>23</sup>.



**Figura 2.1** | Ilustração das diferentes fases de maturação do tomate. A fase I corresponde ao tomate verde maduro, a fase II ao tomate *breaker*, a fase III ao tomate *turning*, a fase IV ao tomate rosa, a fase V ao tomate vermelho e, finalmente, a fase VI ao tomate vermelho maduro. Adaptado de Thengane & Gawande, 2018.

## Introdução Teórica

Durante a maturação do fruto decorrem inúmeras reações bioquímicas das quais resultam inúmeras alterações de composição (Figura 2.2) com impacto nas características organoléticas do fruto. São disso exemplos importantes: a degradação da clorofila acompanhada pela biossíntese dos pigmentos carotenoides, nomeadamente do licopeno<sup>25</sup>, a diminuição da acidez titulável, o aumento do teor de açúcares simples (glucose e frutose) e o desenvolvimento da composição aromática<sup>26</sup>. Consequentemente, os frutos mais maduros apresentam intensificação da tonalidade vermelha, com menor acidez e maiores níveis de doçura. Normalmente, durante a maturação, verifica-se igualmente um ligeiro aumento no teor em ácido ascórbico, a manutenção da composição fenólica e a diminuição de compostos glicoalcaloides tóxicos (tomatina e solanina)<sup>26,27</sup>.



**Figura 2.2 |** Alterações composicionais no tomate durante a maturação.

No tomate, o teor de carotenoides (em particular, do licopeno) é o principal responsável pela coloração do fruto e, por isso, quanto mais avermelhado for o fruto, maior a sua concentração. Portanto, o tomate não amadurecido ou em fases iniciais de maturação contém uma menor concentração de licopeno<sup>11</sup>. Para além deste composto, o teor de β-caroteno, um pigmento carotenóide responsável pela coloração amarela do tomate, também varia durante o processo de maturação do fruto, atingindo valores máximos na fase rosa<sup>21,25,28</sup>. Os ácidos cítrico e málico são os principais responsáveis pelo sabor típico do tomate. Os respetivos teores aumentam gradualmente durante a maturação do fruto, alcançando valores máximos nas fases *breaker* e/ou rosa<sup>29</sup>. Os principais açúcares redutores presentes no tomate são a glucose e a frutose, cujos teores se correlacionam diretamente com o teor em sólidos solúveis (expresso em %; °Brix). O aumento da respetiva concentração alcança valores máximos no fruto totalmente maduro<sup>21,30</sup>.

O teor em glicoalcaloides (solanina e tomatina) pode constituir um fator de risco para o consumo de TV, em fresco. De facto, estes compostos, considerados tóxicos e antinutricionais,

## Introdução Teórica

podem estar presentes em quantidades elevadas nos frutos não amadurecidos (500 mg kg<sup>-1</sup> peso seco)<sup>31,32</sup>. No entanto, como os respectivos teores vão diminuindo ao longo da maturação, o consumo do fruto maduro é considerado seguro. Não existe legislação específica para o tomate, porém a quantidade de glicoalcaloides admitida em alimentos deve situar-se abaixo do valor limite de 200 ppm, segundo o “*Nordic Group on Risk Assessment and Food Toxicology*”<sup>33</sup>. A valorização alimentar de frutos de tomate não amadurecido deverá considerar este risco para a saúde, existindo, para tal, muitos estudos focados no desenvolvimento de estratégias para a diminuição dos respectivos teores. Entre elas, salienta-se a aplicação de processos de fermentação<sup>34,35</sup> com utilização de algumas estirpes de bactérias do ácido láctico como uma forma de diminuir o teor em glicoalcaloides no tomate.

### 3. Fermentação láctica

---

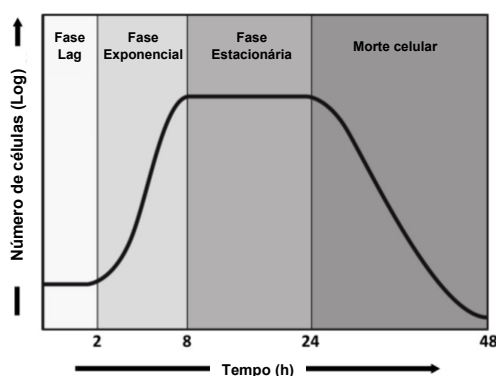
A fermentação é considerada um método de conservação antigo, simples e importante no desenvolvimento de alimentos e bebidas, permitindo manter/melhorar a segurança e a qualidade nutricional e sensorial e prolongar o período de validade dos produtos fermentados<sup>8,16,19</sup>. Esta metodologia tem sido utilizada na valorização de diferentes HF que não eram convencionalmente conservados por esta via, demonstrando-se como uma estratégia de valorização alimentar para reduzir as perdas pós-colheita<sup>27,36,37</sup>. O processo de fermentação é um processo metabólico, no qual produtos a fermentar são sujeitos às ações de microrganismos e/ou enzimas. Durante este processo, há formação dos ácidos láctico ou acético e a conseqüente acidificação (diminuição do pH), que inibe o desenvolvimento de bactérias patogênicas ou de deteriorização<sup>8,16</sup>. A fermentação contribui, assim, para o aumento da segurança microbiológica do produto e, paralelamente, para o aumento do respectivo período de validade<sup>19</sup>, sem necessitar da adição de conservantes. Para além do aumento da capacidade de conservação alimentar (ácidos orgânicos como fatores de inibição), a fermentação é igualmente responsável pela melhoria das propriedades organolépticas dos alimentos através do desenvolvimento de uma diversidade de sabores, aromas e textura e pelo enriquecimento do aporte nutricional/funcional (enriquecimento biológico de substratos alimentares como proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos gordos essenciais e vitaminas) e, eventualmente, do potencial probiótico<sup>38</sup>. Este método pode igualmente conduzir à diminuição de compostos tóxicos como os glicoalcaloides solanina e tomatina, permitindo reduzir os respectivos teores cujo risco é mais elevado em frutos de tomate não amadurecido<sup>39,40</sup>.

Assim, os fermentados de origem vegetal são alimentos de baixo índice calórico porque veiculam menores teores de açúcares comparativamente aos seus congêneres em cru. Constituem ainda uma fonte de fibras dietéticas, desempenhando um papel essencial na regulação da assimilação de gorduras e funcionamento do trato intestinal. São também uma importante fonte de ácido ascórbico, vitaminas do grupo B, compostos fenólicos e muitos outros nutrientes presentes na matéria-prima<sup>19</sup>.

### 3.1. Bactérias do ácido láctico (BAL)

Em termos gerais, estima-se que a população microbiana nos HF oscile entre 5 e 7 log UFC/g, a maioria da qual constituída por bactérias gram-negativas, bacilos gram-positivos e bolores e leveduras (B&L)<sup>41</sup>. As bactérias do ácido láctico (BAL) representam uma pequena parte da microbiota dos HF (2–4 log UFC/g), sendo a sua proporção influenciada pelo tipo de produto, temperatura e condições pré-colheita<sup>16,19</sup>. As BAL são um grupo de microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativos, com baixo teor de guanina-citosina, ácido tolerantes e morfologicamente heterogêneas. A maioria das BAL desenvolve-se anaerobiamente, mas a presença de oxigênio não é impeditivo para o seu desenvolvimento dada a respetiva tolerância<sup>16</sup>. Estas bactérias fermentam hidratos de carbono (entre eles, glucose) com formação preferencial de ácido láctico, responsável pela diminuição do pH dos fermentados para valores próximos de 4. Desta forma, as BAL promovem a estabilidade do produto fermentado, uma vez que, perante estes valores de pH inferiores, o desenvolvimento da microbiota de deterioração e de bactérias patogénicas é muito limitado.

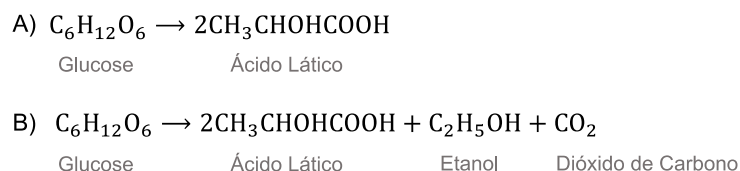
Geralmente, o desenvolvimento microbiano (e em particular o das BAL) decorre durante várias fases: a fase lag, na qual os microrganismos se adaptam ao meio; a fase exponencial, que corresponde ao período de desenvolvimento ótimo da população microbiana; a fase estacionária, na qual o número de microrganismos atinge um valor máximo e com manutenção dos níveis microbianos; e, finalmente, a morte celular (Figura 3.1).



**Figura 3.1** | Fases do crescimento bacteriano. Adaptado de Garrison & Huigens, 2016.

Consoante o metabolismo de açúcares, as BAL podem ser classificadas como bactérias homofermentativas ou heterofermentativas (Figura 3.2). As BAL homofermentativas produzem um único produto de fermentação, o ácido láctico, através da via Embden-Meyerhof. Já as BAL heterofermentativas, para além do ácido láctico, produzem outros metabolitos, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), através da via fosfoctose. As BAL são capazes ainda de produzir outros metabolitos secundários importantes para aumentar a qualidade e vida útil dos produtos fermentados, incluindo exopolissacáridos (EPS – polissacáridos extracelulares que interferem na viscosidade dos fermentados), enzimas e bacteriocinas (péptidos ou pequenas proteínas inibidoras do desenvolvimento de muitas bactérias indesejáveis)<sup>16,43</sup>.

## Introdução Teórica



**Figura 3.2** | Reações de fermentação láctica das (A) BAL homofermentativas e das (B) BAL heterofermentativas. Adaptado de Montet et al., 2013.

Em suma, os efeitos inibitórios promovidos pelo desenvolvimento das BAL face a outras bactérias presentes na microbiota vegetal prendem-se com os seguintes fatores: concorrência pelos nutrientes disponíveis; produção de ácido láctico e consequente diminuição do pH; e produção de metabolitos inibitórios, como bacteriocinas, peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e CO<sub>2</sub>. Cada uma destas propriedades (ou a sua combinação) pode ser utilizada para prolongar o período de validade e aumentar a segurança dos produtos fermentados<sup>19</sup>. Por estas razões, as BAL são fundamentais para a fermentação láctica dos HF. Neste grupo microbiano, as estirpes fermentativas mais utilizadas pertencem aos géneros *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Pediococcus*<sup>8,16</sup>. Em particular, as espécies de *Lactiplantibacillus*, como *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus* e *L. rhamnosus* têm sido as mais exploradas industrialmente<sup>43</sup>. De entre estas, destaca-se *L. plantarum* por ser considerada uma espécie bacteriana ubíqua nos HF e metabolicamente versátil, prevalecendo na fase posterior da fermentação devido à elevada tolerância a meios ácidos<sup>8,41</sup>.

### 3.2. Modos de iniciação

A produção de alimentos fermentados de elevada qualidade depende da presença, desenvolvimento e atividade metabólica de determinados microrganismos. Existem, essencialmente, duas formas de iniciar os processos de fermentação: a fermentação espontânea (por BAL endógenas) e a fermentação controlada que recorre ao uso de culturas puras de microrganismos adicionadas intencionalmente aos HF<sup>19,43</sup>.

A fermentação espontânea depende da microbiota dos HF, nomeadamente da atividade espontânea das BAL endógenas (autóctones). Devido à inerente competição entre os microrganismos fermentativos autóctones e os contaminantes, a sucessão de populações microbianas apresenta um elevado risco de insucesso e pode conduzir a variações indesejáveis nas propriedades sensoriais do produto fermentado<sup>19,43,44</sup>. Em alternativa, tanto do ponto de vista da higiene como da segurança, recomenda-se a opção pela fermentação controlada com utilização de culturas *starter* (CS), uma vez que permite acelerar o processo de fermentação conducente a uma rápida inibição de bactérias patogénicas e de deterioração e, em simultâneo, garantir a produção de fermentados com qualidade sensorial e nutricional consistente e uniforme<sup>19,36</sup>.

## Introdução Teórica

### 3.2.1. Fermentação espontânea

A microbiota dos HF é muito variada, pelo que a fermentação láctica apenas ocorre espontaneamente quando se estabelecem condições favoráveis ao desenvolvimento das BAL autóctones, designadamente, condições anaeróbias, atividade da água, humidade, concentração de sal e temperatura. A adição de sal torna o ambiente mais adequado para o desenvolvimento das BAL e a síntese de dióxido de carbono pelas BAL heterofermentativas contribui para o ambiente de anaerobiose. Além disso, a acidificação da matriz vegetal pelas BAL provoca a morte da microbiota de deterioração menos tolerante ao meio ácido<sup>8,41</sup>. A fermentação espontânea pode resultar em variações indesejáveis nas propriedades sensoriais dos produtos (sabor e aroma) que dependem, à partida, da qualidade da matéria-prima, temperatura e condições pré-colheita<sup>16</sup>. Por outro lado, pode ocorrer tardiamente e, dessa forma, não ter capacidade de inibir eficazmente o desenvolvimento de microrganismos de deterioração e/ou patogénicos<sup>41</sup>. Contrariamente a outros alimentos fermentados (como laticínios e carne), em que a utilização de CS é já uma prática comum, a produção de HF fermentados depende ainda da fermentação espontânea. Para tornar o processo fermentativo mais eficiente, efetua-se a adição de sal como forma de potenciar o desenvolvimento das BAL autóctones<sup>16,41</sup>.

### 3.2.2. Fermentação controlada com estirpes bacterianas

A fermentação láctica controlada (adição de CS) possibilita o desenvolvimento de alimentos funcionais com qualidade padronizada e reprodutível utilizando estirpes bacterianas caracterizadas/selecionadas<sup>41,45</sup>. Para tal, devem ser concebidas condições que favoreçam o desenvolvimento das BAL inoculadas e a eliminação da microbiota do HF. A fermentação pode ser induzida por CS autóctones ou alóctones e as propriedades dos fermentados dependem da estirpe utilizada (Tabela 3.1). CS autóctones dizem respeito a culturas isoladas e reutilizadas na mesma matriz vegetal, enquanto CS alóctones são culturas isoladas de diferentes matrizes e que podem ser utilizadas na fermentação de vários tipos de produtos<sup>8,16,45</sup>, podendo ser disponibilizadas comercialmente. Assim, a utilização de CS previamente selecionadas na fermentação láctica garante uma maior eficiência do processo de fermentação, permitindo a inibição de microrganismos de deterioração e patogénicos e prevenindo a ocorrência de variações indesejáveis e não previsíveis das propriedades sensoriais (cor, sabor e textura) e nutricionais<sup>8</sup>.

**Tabela 3.1** | Propriedades de estirpes autóctones e alóctones usadas como CS no processo de fermentação. Adaptado de Garcia et al. 2020.

<b>Estirpes utilizadas como CS</b>	<b>Propriedades</b>
Estirpes Autóctones	Diminuição rápida do pH
	Consumo significativo de hidratos de carbono fermentáveis
	Inibição de <i>Enterobacteriaceae</i> e leveduras
	Desenvolvimento favorável de cor e propriedades reológicas
Estirpes Alóctones	Fases de latência de desenvolvimento mais longas
	Acidificação tardia

## Introdução Teórica

### 3.2.3. Culturas *starter* alóctones vs. autóctones

A utilização de CS alóctones apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto dos critérios de seleção das estirpes bacterianas ser baseado apenas na capacidade de acidificação rápida, não atendendo a outros fatores importantes como a adaptação às propriedades sensoriais e funcionais da matriz e a adaptação metabólica<sup>8,16</sup>.

A maior adaptação à matriz vegetal das estirpes autóctones traduz-se em melhores desempenhos durante a fermentação e garantem uma maior viabilidade microbiana durante o armazenamento<sup>46,47</sup>. Em geral, a utilização de CS autóctones de BAL na fermentação de HF garante uma melhor aceitação sensorial dos fermentados resultantes. Este facto deve-se à alteração de vários atributos como o desenvolvimento do perfil de ácidos orgânicos, a síntese dos ácidos láctico e/ou relacionado com o metabolismo de aminoácidos livres. Estas alterações podem ter repercussões diretas (diminuição do pH) ou indiretas na atividade de enzimas endógenas com consequências favoráveis no desenvolvimento das propriedades sensoriais (cor, sabor e aroma) dos HF<sup>41,48,49</sup>.

### 3.2.4. Critérios na seleção das culturas *starter* associadas a alimentos

A seleção das CS é indispensável para eleger as estirpes com melhor desempenho fermentativo, sendo realizada em função de determinadas características metabólicas. Embora os tratamentos térmicos (TT) possam, em parte, alterar a composição química da matriz em cru, os meios de cultura de produtos hortícolas ou sumos vegetais previamente esterilizados/pasteurizados são considerados os sistemas de modelo mais adequados no processo de seleção. Os principais critérios de seleção das CS são geralmente divididos em quatro categorias principais: tecnológicos, sensoriais, funcionais e probióticos (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** | Principais critérios (e características metabólicas correspondentes) considerados na seleção de CS para a fermentação de HF. Adaptado de Di Cagno et al., 2016.

<b>Critério de seleção</b>	<b>Características metabólicas</b>
Tecnológico	Taxa de desenvolvimento bacteriano e taxa de acidificação
	Tolerância ao sal e a fenóis
	Desenvolvimento microbiano a valores de pH e temperatura baixos
	Completar o processo fermentativo
	Síntese de compostos antimicrobianos e de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Adaptação metabólica durante a fermentação e armazenamento
Sensorial	Metabolismo heterofermentativo
	Síntese de compostos aromáticos ou precursores
Nutricional/Funcional	Síntese de compostos bioativos e EPS
	Aumento da atividade antioxidante e da biodisponibilidade de compostos funcionais
	Diminuição de fatores antinutricionais e/ou tóxicos
Probiótico	Resistência a meios ácidos e à presença de sais biliares
	Inibição de bactérias patogénicas
	Estimulação de mediadores da resposta imunitária
	Adesão às células intestinais humanas

## Introdução Teórica

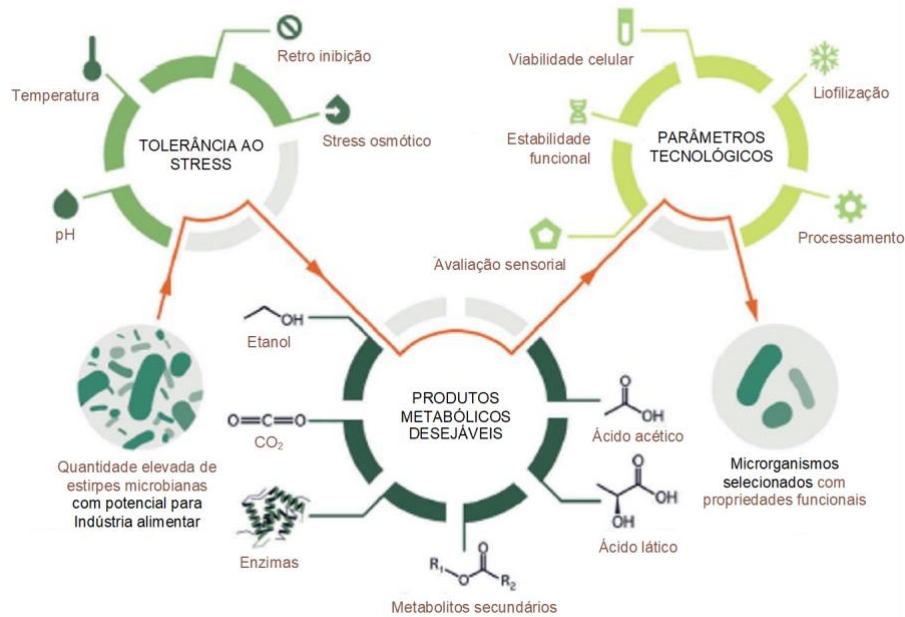
Entre os critérios tecnológicos utilizados, os principais incluem a taxa de desenvolvimento microbiano, a taxa de produção total de ácidos (alterações do pH) e a adaptação/tolerância ambiental. Além disso, a manutenção da elevada viabilidade das BAL na fase estacionária de desenvolvimento, em condições ambientais adversas, é um pré-requisito indispensável que garante aos produtos fermentados um tempo de vida útil prolongado<sup>8,41</sup>. A síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas CS é outro critério utilizado no processo de seleção pois, dado o seu forte poder oxidante, pode reagir com material orgânico, causar a degradação de compostos antioxidantes e conduzir a uma alteração indesejada da cor do produto. A síntese de EPS, que está positivamente correlacionada com a manutenção das tonalidades dos fermentados durante a fermentação, é outra característica importante com influência na respetiva viscosidade (sumos e purés) e propriedades nutricionais<sup>8</sup>. É igualmente desejável que as BAL selecionadas não produzam (ou eliminem) aminas biogénicas, pois estes compostos resultantes da descarboxilação microbiana dos aminoácidos podem ser tóxicos e conferir um sabor desagradável ao produto<sup>16</sup>. A concentração de hidratos de carbono fermentescíveis, o grau de tamponização do meio e os compostos inibitórios são os principais fatores que afetam o desenvolvimento e a capacidade de acidificação das BAL. A avaliação da tolerância das BAL face à presença de elevadas concentrações de fenóis é também necessária em produtos vegetais, cujos teores podem ser elevados.

No curso da fermentação, a diminuição rápida do pH nas primeiras fases do processo é uma condição indispensável para alcançar a inibição de microrganismos indesejáveis. Uma vez concluída a fermentação, é necessário que ocorra o esgotamento de quase todos os hidratos de carbono fermentescíveis para evitar a fermentação alcoólica por leveduras. A sobrevivência de CS autóctones durante os períodos de fermentação e armazenamento é igualmente expectável, sendo que uma elevada quantidade de BAL (> 7 log UFC/mL) pode ser indicativa do carácter probiótico das estirpes bacterianas<sup>8</sup>.

Em geral, nos processos de seleção, o elevado número de estirpes microbianas em avaliação conduz à necessidade de aplicar testes sequenciais para reduzir progressivamente o número de candidatos, incluindo (i) rastreios para condições de fermentação em condições extremas, (ii) identificação dos metabolitos importantes e (iii) avaliação dos parâmetros tecnológicos (Figura 3.3). No final deste procedimento, são selecionadas as estirpes que reúnem o maior número de propriedades desejadas e, concomitantemente, sem quaisquer características negativas<sup>43</sup>.

Finalmente, para fins comerciais (aumento de escala), a CS deve ser capaz de se desenvolver em substratos relativamente baratos, ser resistente à secagem, empacotamento, armazenamento e a processos de re-hidratação e reativação, sem perda das propriedades fermentativas essenciais e desejáveis<sup>43</sup>.

## Introdução Teórica



**Figura 3.3** | Representação esquemática da abordagem polifásica necessária para a seleção de CS. Adaptado de Vinicius de Melo Pereira et al., 2020.

### 3.3. Fatores que influenciam o processo fermentativo

Existem diversos fatores que influenciam o desenvolvimento e a atividade das BAL na fermentação de HF. Entre estes, destacam-se: o pH, a temperatura, a humidade, a disponibilidade de  $O_2$ , a concentração de sal e de inóculo, os nutrientes e a CS selecionada.

O pH é um fator crítico no desenvolvimento e preservação do aroma e sabor de muitos HF fermentados. O desenvolvimento das BAL é normalmente favorecido em condições de pH neutro, mas existem algumas estirpes capazes de sobreviver e desenvolver em meios ácidos, numa gama de pH entre 3 e 4 (ácido tolerantes, como *Lactiplantibacillus*)<sup>16</sup>.

Os requisitos de  $O_2$  variam consoante a espécie microbiana. A maioria das BAL não é sensível à presença de  $O_2$ , podendo desenvolver-se na sua presença e ausência<sup>16</sup>. Contudo, é preferível a utilização de condições anaeróbias por impedir o desenvolvimento de leveduras oxidativas que podem prejudicar o processo fermentativo<sup>50</sup>.

A temperatura é também um fator crítico para a fermentação de HF. A maioria das BAL apresenta como temperatura ótima de desenvolvimento o intervalo 18–22 °C, existindo espécies termófilas, que preferem valores de temperaturas superiores (50–55 °C), e outras (mesófilas) que preferem valores de temperatura mais baixos (15–20 °C)<sup>16</sup>.

Dada a importância da salga na fermentação vegetal, a concentração de cloreto de sódio (NaCl) tem influência no processo fermentativo. O NaCl é adicionado, numa gama entre 2 e 10%<sup>16,51</sup>, com o intuito de dificultar o desenvolvimento de microrganismos de deterioração e de melhorar a consistência do produto fermentado, impedindo o amolecimento excessivo dos tecidos vegetais<sup>50</sup>. Tal é possível pois as BAL são tolerantes a elevadas concentrações de sal, o que lhes confere vantagem sobre outras espécies menos tolerantes<sup>16</sup>. No entanto, concentrações excessivas de NaCl podem igualmente ser prejudiciais ao desenvolvimento das

## Introdução Teórica

BAL, inibindo a produção de ácido láctico e interferindo, conseqüentemente, na diminuição de pH<sup>51</sup>.

A qualidade sensorial do produto deve ser considerada como um dos fatores críticos para o sucesso do produto fermentado e é dependente da correta seleção da CS. Di Cagno et al. (2009) estudaram a fermentação láctica do tomate com adição de estirpes autóctones como CS e constataram, em consequência, diferenças nos perfis voláteis do produto, consoante a estirpe inoculada. Por outro lado, Y. Liu et al. (2018) mostraram a influência da utilização de determinadas estirpes de *Lactiplantibacillus* como CS no desenvolvimento de compostos voláteis com impactos favoráveis na percepção do sabor de fermentados de tomate.

A microbiota dos HF pode igualmente afetar a fermentação láctica. As condições de armazenamento desfavoráveis e a presença de insetos, microrganismos de deterioração (causadores de alterações na cor, odor, sabor, textura e aspeto dos HF devido à sua atividade metabólica) e microrganismos patogénicos (como *Escherichia Coli*, *Salmonella sp.* e *Clostridium botulinum*) não só diminuem o tempo de vida útil dos HF, como também reduzem a sua qualidade e, conseqüentemente, a aceitação do consumidor<sup>53,54</sup>. Por este motivo, os TT, que consistem no aumento de temperatura até níveis letais para os microrganismos, diminuem a carga microbiana endógena e, em consequência, o risco microbiológico dos produtos finais<sup>55</sup>. Os TT mais utilizados industrialmente são a pasteurização, na qual as formas vegetativas dos microrganismos são destruídas, e a esterilização, na qual tanto as formas vegetativas dos microrganismos como os seus esporos são destruídos<sup>54,55</sup>. Ambos os procedimentos reduzem substancialmente a carga microbiana patogénica e de deterioração<sup>56</sup>, originando produtos fermentados seguros e com qualidade e vida útil aceitáveis.

## 4. Produtos fermentados como fonte de probióticos

---

Os probióticos são definidos como culturas de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas (6–7 log UFC/g de alimento), conferem benefícios para a saúde do hospedeiro, tais como contribuir para o equilíbrio da microbiota ou fortalecer o sistema imunitário<sup>45</sup>.

Nos últimos anos, a indústria alimentar tem procurado produzir alimentos com declarados benefícios para a saúde (alimentos funcionais), para além do seu valor nutricional<sup>57</sup>. Neste contexto, têm sido desenvolvidos muitos projetos de investigação centrados na avaliação de diferentes estirpes de BAL com potencial probiótico<sup>58</sup>. Para além disto, a intolerância à lactose num segmento cada vez maior da população mundial, aliada aos inconvenientes associados à presença de colesterol nos produtos lácteos fermentados, perspetivou o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos. Isto exige fontes alternativas de BAL, tais como frutos, leguminosas e cereais, que, através de uma manipulação tecnológica adequada, podem servir de matrizes para a produção de alimentos probióticos<sup>59</sup>. Tal é possível pois os HF possuem características físico-químicas intrínsecas que mimetizam, nalguns aspetos, o trato gastrointestinal humano, designadamente o ambiente extremamente ácido, a capacidade tampão, a elevada concentração de nutrientes não digestíveis (fibra, inulina e fruto-

## Introdução Teórica

oligosacáridos) e a presença de fatores antinutricionais (por exemplo, taninos)<sup>59</sup>. Contudo, as técnicas de conservação utilizadas no processamento de fermentados de HF, como a pasteurização ou a adição de conservantes, podem conduzir à inativação significativa das BAL presentes, anulando, assim, eventuais efeitos probióticos<sup>16</sup>.

### 4.1. Critérios probióticos

Todos os microrganismos considerados probióticos possuem determinadas características (Figura 4.1): elevada capacidade de sobrevivência nas matrizes vegetais ( $\geq 6-7$  log UFC/mL) durante o prazo de validade do produto; não ser patogénico nem tóxico; resistir à passagem no trato gastrointestinal (meio ácido e presença de sais biliares); aderir ao revestimento intestinal das células epiteliais e colonizar o lúmen do trato; produzir substâncias antimicrobianas contra os agentes patogénicos; estabilizar a microflora intestinal; e estar associado a benefícios fisiológicos<sup>43,45,59</sup>, entre outras. As estirpes bacterianas com atividade probiótica são capazes de competir com agentes patogénicos por locais de adesão, antagonizar os mesmos ou modular a resposta imune do hospedeiro, o que irá melhorar a nutrição, aliviar as doenças intestinais, melhorar o sistema imunitário, otimizar a ecologia intestinal e, finalmente, promover a saúde em geral. As principais bactérias consideradas probióticas pertencem aos géneros *Lactiplantibacillus*, *Bifidobacterium* e *Leuconostoc*<sup>60,61</sup>.



**Figura 4.1** | Características probióticas de seleção das estirpes bacterianas. Adaptado de Garcia et al., 2020.

### 4.2. Benefícios de fermentados vegetais com características probióticas

O consumo de vegetais fermentados tem sido associado a um conjunto de benefícios para a saúde decorrentes do desenvolvimento e atividade de estirpes de BAL probióticas. Muitos estudos referenciam múltiplos benefícios, incluindo a prevenção de interferência patogénica, modulação imunitária, síntese e melhoria da biodisponibilidade dos nutrientes, atividades anticancerígena e antimutagénica, redução dos sintomas de intolerância à lactose, dos níveis de

## Introdução Teórica

colesterol no soro, da pressão arterial e de doenças cardiovasculares, prevenção da vaginose bacteriana e infecção do trato urinário, manutenção da integridade mucosa e melhoria da saúde periodontal<sup>43,45,59</sup>. Em particular, algumas estirpes de BAL em diversos HF fermentados têm demonstrado possuir propriedades anticancerígenas e antimutagênicas ao inibir compostos cancerígenos no trato gastrointestinal através da redução da atividade enzimática das bactérias fecais ou da quebra de certas enterotoxinas<sup>16</sup>.

## 5. Objetivos

---

O objetivo principal deste trabalho consiste no desenvolvimento de uma estratégia para a valorização de frutos de tomate-indústria não amadurecido rejeitados pela indústria de concentrado de tomate com base na sua fermentação láctica, como contributo para a redução do desperdício alimentar e promoção da diversificação de alimentos fermentados não lácteos.

Como objetivos específicos, destacam-se:

- Caracterizar a matéria-prima, tomate-indústria não amadurecido (*cv.* H1015), em diferentes estados de maturação nas vertentes físico-química e microbiológica.
- Isolar, caracterizar e identificar estirpes de BAL autóctones com vista à sua posterior utilização como culturas *starter*.
- Avaliar o potencial probiótico *in vitro* e a tolerância à adição de solanina de estirpes de BAL isoladas da microbiota da matéria-prima (autóctones) e de estirpes previamente selecionadas a partir da coleção bacteriana do INIAV (alóctones).
- Avaliar o desempenho fermentativo das estirpes alóctones e autóctones (e o efeito da adição de sal) e caracterizar os respetivos fermentados durante o período de armazenamento (14 dias).

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6. Procedimentos de preparação das amostras

---

#### 6.1. Receção da matéria-prima

Neste trabalho, foram utilizados frutos de TV, do cv. H1015 (variedade mais utilizada na produção de tomate-indústria), fornecidos pelo Centro Competências Tomate Indústria (CCTI), coletados manualmente na região do Ribatejo (municípios de Azambuja, Benavente, Cartaxo e Vila Franca de Xira) e transportados rapidamente para as instalações da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). À chegada ao laboratório, os frutos foram selecionados (inspeção visual) quanto à sua coloração superficial e separados em duas categorias: frutos totalmente verdes (designados por categoria verde) e frutos com diferentes proporções de cores verde, encarnado e amarelo (designados por categoria intermédia) (Figura 6.1). Antes de serem armazenados, todos os frutos foram lavados em água corrente, através da sua imersão em tinas de água, e secos com papel absorvente. Por fim, os frutos foram pesados, acondicionados em sacos devidamente identificados por categoria e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  numa câmara de refrigeração (Cryocell Aralab, Rio de Mouro, Portugal). Para o cumprimento de todos os ensaios, procedeu-se à descongelação faseada dos mesmos para prevenir perdas da integridade dos frutos. Assim, os frutos foram transferidos da câmara a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uma câmara à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Iberia, Itália), e, ao final de ca. 24 h, realizou-se a colocação dos mesmos à temperatura ambiente.



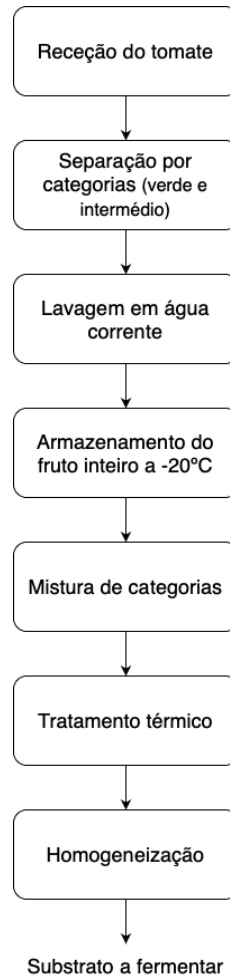
Figura 6.1 | Categorias do TV: verde (à esquerda) e intermédia (à direita).

#### 6.2. Processamento em polpa

Os homogeneizados (polpas) de TV foram preparados na oficina tecnológica da UTI-INIAV. Para o efeito, foram utilizados frutos das categorias verde e intermédia numa proporção de 1:1. Esta proporção foi selecionada com base no cálculo prévio da proporção média destas categorias no campo (%). A mistura de frutos inteiros foi submetida a um TT com o intuito de reduzir a carga microbiana inicial. Para tal, os frutos foram imersos em banho de água a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto num autoclave (Uniclave 88 AJC, Cacém, Portugal), tendo-se utilizado termopares do tipo T (Ellab CMC.RP) na monitorização da temperatura ao longo do tratamento. O tempo de tratamento foi contabilizado a partir do momento em que a temperatura da água retomou o valor estipulado. Seguiu-se o arrefecimento rápido dos frutos pela respetiva imersão

## Materiais e Métodos

em banho de gelo fundente (0 °C) e secagem com papel absorvente. Após o TT, os frutos foram homogeneizados num robot de cozinha (Bimby, Vorwerk, Wuppertal, Alemanha) durante 1 minuto à velocidade máxima e, posteriormente, distribuídos em frascos (Figura 6.2/Figura 6.3). A posterior manipulação e o processo de homogeneização foi executado em condições higiénico-sanitárias cuidadas. Assim, as bancadas de trabalho, facas, equipamentos e recipientes foram lavados e desinfetados com solução de etanol a 70%, de forma a prevenir contaminações durante o processamento. A distribuição da polpa nos frascos foi realizada numa câmara de fluxo laminar (NU-201 4 ft Laminar Flow Hood, NuAire).



**Figura 6.2** | Esquema de operações para a preparação de polpas.



**Figura 6.3** | Aspeto dos homogeneizados de tomate.

### 7. Procedimentos microbiológicos

---

Todas as determinações microbiológicas foram realizadas na Unidade de Microbiologia da UTI–INIAV. As práticas laboratoriais foram realizadas de acordo com a norma ISO 7218:2007 e a preparação das amostras e diluições de acordo com a norma ISO 6887-1:2017.

#### 7.1. Condições de cultura das estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas da coleção do INIAV estão registadas, caracterizadas e identificadas, tendo sido isoladas a partir de diferentes produtos tradicionais portugueses (entre as quais, salmoura de azeitona, doce de abóbora, ketchup e concentrado de tomate), e encontram-se armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes da sua utilização, todas as estirpes de BAL foram ativadas em meio de cultura MRS líquido (do inglês, *Man, Rogosa and Sharpe*; Biokar Diagnostics, Allone, França) incubado a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. De seguida, as culturas bacterianas foram plaqueadas, por incorporação, em MRS agar (Biokar Diagnostics, Allone, França) e novamente incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h para garantir a sobrevivência, estabilidade e pureza. Suspensões celulares homogêneas de cada estirpe foram preparadas através da dispersão das culturas desenvolvidas *overnight* numa solução de 0,85% NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e ajustadas com soro fisiológico para atingir a turbidez de 5 segundo o padrão McFarland (correspondente a uma densidade celular de ca.  $9\text{ log UFC/mL}$ ). Por fim, foram distribuídas para cada frasco de fermentação de modo a atingir uma concentração inicial de  $8\text{ log UFC/mL}$ .

#### 7.2. Contagens microbiológicas

##### 7.2.1. Bactérias do ácido láctico (BAL)

O procedimento geral para a contagem de BAL foi cumprido de acordo com a norma ISO 15214:1998. Para esta determinação, foram realizadas diluições decimais sucessivas das estirpes em triptona sal (Biokar Diagnostics, Allone, França) e as diluições consideradas adequadas foram inoculadas (1 mL) em meio MRS agar, por incorporação e com camada dupla. Após incubação a  $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $72 \pm 4\text{ h}$ , efetuou-se a contagem das BAL, expressa em log UFC/mL, através da seguinte equação (Equação 7.1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

**Equação 7.1** | Equação para contagem de BAL e outros grupos microbiológicos (log UFC/mL), em que N corresponde ao número de microrganismos,  $\sum C$  ao somatório das colónias contabilizadas em duas placas inoculadas a partir de duas diluições sucessivas, V ao volume de inóculo (em mL) e d à menor diluição das placas contabilizadas e utilizadas no somatório.

##### 7.2.2. Bolores e leveduras (B&L)

A contagem de B&L foi realizada segundo a norma ISO 21527-1:2008. Para o efeito, foi utilizado o meio de cultura DRBC agar (do inglês, *Dichloran Rose-Bengal Chlorotetracycline Agar*; Biokar Diagnostics, Allone, França), para o qual se transferiu 0,1 mL da suspensão mãe e de cada diluição preparada para o respetivo meio. Após incubação a  $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 dias, em condições aeróbias, efetuou-se a contagem de B&L segundo a Equação 7.1.

## Materiais e Métodos

### 7.2.3. Microrganismos a 30 °C

A contagem de microrganismos a 30 °C foi realizada segundo a norma ISO 4833-1:2013. Para tal, realizaram-se diluições decimais sucessivas em solução de Ringer (Biokar Diagnostics, Allone, França), que foram posteriormente incubadas em meio PCA (do inglês, *Plate Count Agar*; Biokar Diagnostics, Allone, França) a 30 °C durante 72 h e contabilizadas com recurso à Equação 7.1.

### 7.2.4. Microrganismos patogénicos

As bactérias *Staphylococcus coagulase* positivas foram contabilizadas segundo a norma ISO 6888-2:2021, em meio de cultura RPF (do inglês, *Rabbit Plasma Fibrinogen*; Biokar Diagnostics, Allone, França) após incubação a  $37 \pm 1$  °C durante 36–48 h. Os coliformes foram contabilizados em meio VRBA (do inglês, *Violet Red Bile Agar*; Biokar Diagnostics, Allone, França) após incubação a  $30 \pm 1$  °C durante  $24 \pm 2$  h, de acordo com a norma ISO 4832:2006. Por fim, as contagens de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) foram determinadas segundo a norma ISO 16649-1:2018, em meio TBX (do inglês, *Tryptone Bile X-Glucuronide*; Biokar Diagnostics, Allone, França) após incubação  $44 \pm 1$  °C durante 18–24 h. As contagens de todos os grupos patogénicos foram determinadas com recurso à Equação 7.1.

## 7.3. Isolamento das estirpes de BAL autóctones

As estirpes de BAL autóctones foram isoladas a partir de polpa de TV, que foi diluída (diluições decimais seriadas) em triptona sal, plaqueada em meio MRS agar e incubada, em condições anaeróbias, a 30 °C durante 72 h para o isolamento de 5–10 colónias a partir de cada diluição contável. As colónias isoladas foram sucessivamente repicadas em meio MRS líquido para garantia da respetiva pureza e, posteriormente, conservadas sob congelação (–80 °C) em meio MRS líquido com 50 % glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) como crioprotetor.

## 7.4. Congelação e ativação de estirpes puras de BAL

O meio de congelação consistiu em meio MRS líquido e glicerol, na proporção 1:1. Ca. 1 mL do meio foi adicionado aos tubos de congelação (Cryovial) previamente esterilizados e, de seguida, inocularam-se as respetivas estirpes bacterianas nos referidos tubos com o auxílio de uma ansa. Finalmente, as estirpes foram mantidas congeladas a –80 °C numa câmara refrigerada (MediCool 4-door MPR-411FR, SANYO, Osaka, Japão) até à sua análise<sup>70</sup>.

A ativação das estirpes consistiu na sua inoculação em meio MRS líquido e posterior incubação a 30 °C durante 24 h. Este procedimento foi repetido, pelo menos, duas vezes e, para confirmar a pureza das estirpes, foram transferidos 0,2 mL da cultura em caldo para meio MRS agar e incubados durante 24 h a 30 °C.

## 7.5. Caracterização e identificação das estirpes autóctones

### 7.5.1. Exame a fresco

O exame a fresco consistiu na análise microscópica dos microrganismos vivos, durante a qual foi possível observar a sua morfologia e mobilidade<sup>71</sup>. Em condições de assepsia, colocou-

## Materiais e Métodos

-se uma gota de água destilada sobre uma lâmina de microscópio, à qual se adicionou posteriormente colónias bacterianas. A suspensão foi coberta cuidadosamente com uma lamela e posteriormente observada ao microscópio ótico (Leitz Dialux 20, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) sob objetiva de 40x.

### 7.5.2. Teste da catalase

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima intracelular capaz de degradar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigénio molecular. Este teste consistiu na deposição de uma gota de água oxigenada sobre uma lâmina de microscópio e a posterior adição de uma colónia bacteriana, em condições de assepsia. A formação de bolhas aquando da mistura entre a colónia e a água oxigenada é indicativo da presença da enzima catalase. Contrariamente, a ausência de formação de bolhas traduz um resultado negativo, o qual assinala a ausência de catalase<sup>72,73</sup>.

### 7.5.3. Teste de hidróxido de potássio

O teste de reação ao hidróxido de potássio é um método simples e eficaz para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em alternativa ao teste da coloração de Gram<sup>72</sup>. Este método avalia a resistência da parede bacteriana à ação de lise provocada pelo KOH<sup>74</sup>. Este teste foi realizado sob condições de assepsia e consistiu na deposição de uma colónia bacteriana sobre uma gota de KOH 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), previamente aplicada numa lâmina de microscópio. De seguida, examinou-se a viscosidade da amostra com o auxílio de uma ansa. A parede celular das bactérias Gram-negativas não é resistente à solução de KOH 3%, pelo que ocorre lise celular durante o teste, evidenciado pela formação de um fio viscoso (resultado positivo). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular mais resistente à ação de KOH 3%, pelo que não há libertação do seu material genético e, portanto, não se observa mudança de viscosidade (resultado negativo)<sup>74</sup>.

### 7.5.4. Método API

O Índice de Perfil Analítico (API, do inglês *Analytical Profile Index*) é um método fácil, rápido e fiável de identificação microbiana, que se baseia num conceito de identificação numérica. Este método realiza-se através de galerias constituídas por vários testes bioquímicos individuais com diversos químicos desidratados em pequenos poços, onde são inoculadas as suspensões bacterianas puras. Existem diferentes kits API (entre eles, o 50 CHL) que apresentam diferentes testes bioquímicos consoante os grupos de bactérias em estudo<sup>73</sup>. Atualmente, a estas galerias está associada uma ferramenta de software, o *apiweb*<sup>TM</sup> (no caso da BioMérieux), que facilita a identificação microbiana.

O kit API 50 CHL (BioMérieux S.A, Marcy L'Etoile, França) é direcionado para a identificação de BAL (nomeadamente, *Lactobacillus* e géneros relacionados) e permite testar facilmente a fermentação de 49 hidratos de carbono. Uma galeria API 50 CHL é composta por 5 faixas, cada uma constituída por 10 poços com diferentes substratos de hidratos de carbono (Figura 7.1). Cada poço é inoculado com a suspensão bacteriana e, durante a incubação, os hidratos de carbono (que são fermentados em ácidos) provocam um decréscimo do pH, detetável

## Materiais e Métodos

pela mudança de coloração. O conjunto de resultados traduz o perfil bioquímico da estirpe testada e é usado para a respetiva identificação através do software *apiweb*<sup>TM 75</sup>.



**Figura 7.1** | Galerias API 50 CH.

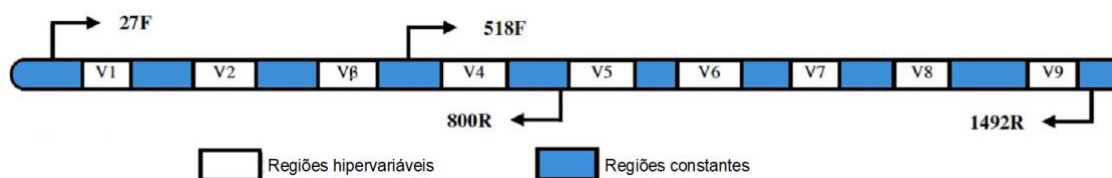
O inóculo foi preparado segundo as indicações do fabricante<sup>75</sup>, tendo-se transferido assepticamente uma cultura pura de cada estirpe do meio MRS agar onde tinha sido cultivada para uma ampola de meio API 50 CHL, até esta obter uma turbidez equivalente a 2 na escala de McFarland. De seguida, esta suspensão foi transferida para os poços com uma micropipeta esterilizada e cobertos com 50  $\mu$ L de óleo de parafina. O primeiro poço da tira foi usado como controlo. Finalmente, a galeria foi incubada a 37 °C durante 48 h e, após incubação, cada poço foi observado relativamente a mudanças de cor. Um resultado positivo foi confirmado pela mudança da cor do indicador roxo de bromocresol de roxo para amarelo, com exceção do poço nº 26 (teste de hidrólise de esclulina), cujo resultado positivo provocou a mudança da cor roxa para preto. Na ausência de mudanças de cor, considerou-se um resultado negativo. Os resultados foram introduzidos e analisados no *software* de identificação *apiweb*<sup>TM</sup> (BioMérieux v5.1, Marcy L'Etoile, França), que inclui uma base de dados capaz de identificar de forma viável ca. 600 espécies de bactérias e leveduras, incluindo espécies de *Lactobacillus*.

### 7.5.5. Extração do DNA para sequenciação genómica

Para a extração do DNA das estirpes de BAL, suspendeu-se cada colónia bacteriana em tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) esterilizado, ao qual se seguiu a aplicação de gotas da suspensão num cartão FTA (do inglês *Flinders Technology Associates*) e a posterior secagem durante 2 h à temperatura ambiente. Após a secagem completa das amostras, estas foram armazenadas num saco de plástico à temperatura ambiente e enviadas para os laboratórios StabVida.

Nos laboratórios StabVida, procedeu-se à amplificação do fragmento genómico 16S rDNA (Figura 7.2) por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), tendo-se, para tal, utilizado os *primers* universais 27F (5'GAGTTTGATCATGGCTCAG3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3').

## Materiais e Métodos



**Figura 7.2** | Representação esquemática do gene 16S rDNA bacteriano e da localização dos *primers* de sequenciação. O produto de PCR resultante foi sequenciado utilizando os quatro *primers* representados. A sequência consensus foi obtida a partir da união de toda a região amplificada.

De seguida, sequenciou-se o DNA dos produtos amplificados através do método de Sanger<sup>76</sup>, em ambos os sentidos, tendo-se recorrido ao kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) com os *primers* universais 27F, 518F (5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG3'), 800R (5'TACCAGGGTATCTAATCC3') e 1492R, conforme o protocolo do fabricante. Posteriormente, efetuou-se o alinhamento das sequências obtidas para originar uma sequência consensus. Por fim, com recurso à ferramenta bioinformática BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool* – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparou-se a sequência consensus de cada estirpe com as diversas sequências anotadas na base de dados NCBI (do inglês *National Center of Biotechnology Information*), o que possibilitou a identificação das estirpes. No final, os produtos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% a 120 V durante 20 minutos e, posteriormente, visualizados sob luz ultravioleta.

## 8. Determinações físico-químicas e avaliação sensorial

### 8.1. Teor de humidade

O teor de humidade foi determinado segundo a norma NP-875 (1994) e corresponde à perda de massa seca a  $\pm 105$  °C até massa constante. Os resultados médios, expressos em % (m/m), resultaram de 3 determinações por amostra utilizando a seguinte equação (Equação 8.1):

$$\text{Teor de humidade} = \frac{(mc + ma) - mf}{ma} \times 100$$

**Equação 8.1** | Equação para a determinação do teor de humidade (%), em que mc corresponde à massa da placa de vidro (em g), ma à massa da amostra (em g) e mf à massa final (em g).

### 8.2. pH

O pH foi determinado com recurso a um potenciómetro (Crison micro pH 2001, Barcelona, Espanha), previamente calibrado à temperatura ambiente, com soluções tampão de pH = 4 e pH = 7 (Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, França). Os valores médios de pH resultaram de 3 determinações por amostra.

### 8.3. Teor de sólidos solúveis (TSS)

O TSS foi determinado com recurso a um refratómetro digital (Atago Palette PR-201, Tóquio, Japão), previamente calibrado com água destilada. Os valores médios, expressos em °Brix, resultaram de 3 determinações por amostra.

### 8.4. Acidez titulável (AT)

A AT foi determinada de acordo com a norma NP-1421 (1977), com ligeiras alterações. Inicialmente, misturou-se 5 g de polpa de TV com água destilada num balão de 50 mL. Tomas desta solução (10 mL) foram tituladas, sob agitação contínua, com uma solução de NaOH 0,1 M (Honeywell, Charlotte, Carolina do Norte, EUA) até pH = 8,2, com recurso a um titulador automático (Metrohm 665 Dosimat, São Paulo, Brasil), anotando-se o volume de NaOH gasto. Os valores médios de AT, expressos em gramas de ácido láctico por 100 g de produto fresco (g AL/100 g PF), resultaram de 3 determinações por amostra e foram calculados segundo a seguinte equação (Equação 8.2):

$$AT = \frac{(V_{\text{total}} \times V_{\text{NaOH}}) / V_{\text{toma}}}{\text{massa amostra}} \times 0,1 \times 0,090 \times 100$$

**Equação 8.2** | Equação para a determinação da AT (g AL/100 g PF), em que  $V_{\text{total}}$  corresponde ao volume total de amostra (em mL),  $V_{\text{NaOH}}$  corresponde ao volume adicionado de NaOH (em mL),  $V_{\text{toma}}$  corresponde ao volume da toma para análise (em mL), 0,1 corresponde à normalidade da solução de NaOH e 0,090 corresponde à constante que permite expressar os valores de AT em gramas de ácido láctico.

### 8.5. Preparação de extratos metanólicos

Os extratos metanólicos utilizados nas determinações do conteúdo fenólico total (CFT) e da atividade antioxidante (AOx) foram preparados a partir da mistura de 1:8 (p:v) de polpa de TV com metanol 100% (Honeywell, Charlotte, Carolina do Norte, EUA), homogeneizada a 20 000 rpm durante 1 min (Polytron Ultra-Turrax T 25 basic, IKA-Werke, Staufen, Alemanha) e incubada durante 10 minutos em banho de ultrassons (Sotel Branson 2200 Ultrasonic Cleaner). Após o armazenamento da mistura *overnight* em ambiente refrigerado ( $4 \pm 1$  °C), seguiu-se a sua centrifugação a 7000 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall Instruments), com recolha do sobrenadante (extratos) em tubos *Falcon*, que foram posteriormente congelados a -20 °C (Large Upright AEG OKO\_ARCTIS Freezer). Antes da análise, os extratos foram previamente armazenados a 5 °C durante 24 h.

### 8.6. Conteúdo fenólico total (CFT)

A determinação do CFT baseia-se na reação colorimétrica promovida pelo reagente Folin-Ciocalteu e foi efetuada como descrito por Swain & Hillis (1959), com algumas modificações. Este reagente, que apresenta uma cor amarela na sua forma oxidada, reduz-se na presença de compostos fenólicos e forma um complexo de cor azul<sup>80</sup>.

Para o efeito, adicionaram-se 2400 µL de água destilada, 150 µL de extrato (cf. 8.5) e 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu 0,25 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em tubos de ensaio. Agitou-se a mistura e, após 3 minutos, adicionou-se 300 µL de carbonato de sódio 1 M (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), tendo-se seguido um período de espera de 2 h no escuro, à temperatura ambiente. As leituras espectrofotométricas foram efetuadas a  $\lambda = 725$  nm (Espectrofotómetro Jas.co V-530 UV/Vis, Japão). Os resultados médios foram calculados através da Equação 8.3 e expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de produto fresco (mg EAG/100 g PF):

## Materiais e Métodos

$$\text{CFT} = \left( \frac{\text{Abs}_{725\text{nm}} - b}{m} \right) \times \left( \frac{\text{volume extrato} + \text{peso amostra}}{\text{peso amostra}} \right) \times \text{FD} \times 100$$

**Equação 8.3** | Equação para a determinação do CFT (mg EAG/100 g PF), em que  $m$  e  $b$  representam o declive e a ordenada na origem da reta de calibração, respetivamente, e FD o fator de diluição.

Os cálculos basearam-se na interpolação dos valores de absorvância utilizando uma reta de calibração com ácido gálico (Panreac Química AS, Barcelona, Espanha), para a qual foram preparadas diversas soluções padrão com metanol 100%, por sucessivas diluições, na gama 0,004–0,600 mg/mL. Estas soluções foram submetidas ao mesmo doseamento e permitiram construir as retas de calibração apresentadas no Anexo A –.

### 8.7. Atividade antioxidante (AOx)

A AOx foi determinada através do método de DPPH e baseou-se nos procedimentos descritos por Arnao *et al.* (2001) e Brand-Williams *et al.* (1995), com algumas modificações. Este método utiliza o radical livre estável de azoto DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), cuja cor roxa se altera para amarelo após respetiva redução na presença de compostos antioxidantes<sup>83</sup>.

O radical DPPH (TCI Chemicals, Zwijndrecht, Bélgica) foi previamente diluído em metanol (1:4,5, v:v) de modo a apresentar uma absorvância inicial de  $1,10 \pm 0,02$  a  $\lambda = 580$  nm. A mistura de reação foi preparada a partir de 150  $\mu\text{L}$  de extrato (cf. 8.5) e de 2850  $\mu\text{L}$  da solução preparada de DPPH, e incubada à temperatura ambiente durante 2 h no escuro. Após este período de reação, a redução da absorvância foi medida espectralmente a  $\lambda = 580$  nm (Espectrofotómetro Jas.co V-530 UV/Vis, Japão). Foi igualmente preparada uma reta de calibração com várias soluções padrão de Trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), na gama 82–10 000  $\mu\text{M}$  (Anexo B –), submetidas ao mesmo doseamento. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de equivalentes de Trolox por 100 g de produto fresco ( $\mu\text{M}$  ET/100 g PF) e calculados através das seguintes equações (Equações 8.4):

$$\Delta\text{DPPH} = \text{Abs}_{580\text{nm}}\text{DPPH} - \text{Abs}_{580\text{nm}}\text{amostra}$$

$$\text{AOx} = \left( \frac{\Delta\text{DPPH} - b}{m} \right) \times \left( \frac{\text{volume extrato} + \text{peso amostra}}{\text{peso amostra}} \right) \times \text{FD} \times 100$$

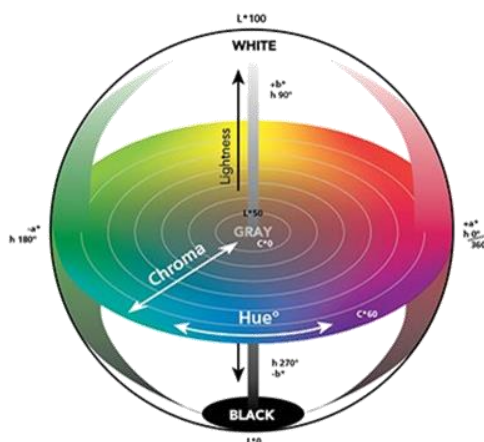
**Equações 8.4** | Conjunto de equações para a determinação da AOx através do método DPPH ( $\mu\text{M}$  ET/100 g PF), em que  $\Delta\text{DPPH}$  corresponde ao decréscimo da  $\text{Abs}_{580\text{nm}}$ ,  $\text{Abs}_{580\text{nm}}\text{DPPH}$  à absorvância da solução de DPPH preparada,  $\text{Abs}_{580\text{nm}}\text{amostra}$  à absorvância da amostra,  $m$  e  $b$  ao declive e ordenada na origem da reta de calibração, respetivamente, e FD ao fator de diluição.

### 8.8. Parâmetros colorimétricos CIELab

A cor das polpas de TV foi avaliada no sistema CIELab (Iluminante C), com recurso ao colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300 (Osaka, Japão), cuja calibração foi efetuada com um padrão branco de referência ( $L^* = 97,10$ ;  $a^* = 0,19$ ;  $b^* = 1,95$ ). No sistema CIE, o valor de  $L^*$  representa a luminosidade e traduz a variação entre escuro e claro, em que 0 equivale a preto e 100 a branco. O valor de  $a^*$  traduz a variação entre vermelho (+60) e verde (–60) enquanto o valor de  $b^*$  traduz a variação entre amarelo (+60) e azul (–60), com ambas as coordenadas a aproximarem-se de 0 para cores neutras (branco, cinzento e preto)<sup>84</sup>. Para cada replicado, foram

## Materiais e Métodos

efetuadas 5 medições. Posteriormente, foram calculados os parâmetros de tonalidade ( $^{\circ}h$ ), índice de escurecimento (WI) e diferença total de cor (DTC). Na Figura 8.1 está ilustrado um esquema do modelo do sistema espacial de cromaticidade CIELab.



**Figura 8.1** | Modelo do sistema espacial de cromaticidade CIELab, com ilustração das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , assim como os parâmetros  $C^*$  e  $^{\circ}h$ . Retirado de Mouw (2018).

A tonalidade da cor é transmitida pelo ângulo  $^{\circ}h$  (Equações 8.5), que varia pelos eixos dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , com o ângulo  $0^{\circ}$  a corresponder ao vermelho, o ângulo  $90^{\circ}$  ao amarelo, o ângulo  $180^{\circ}$  ao verde e o ângulo  $270^{\circ}$  ao azul<sup>84</sup>.

$$^{\circ}h = \frac{\tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \quad \text{se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0$$

$$^{\circ}h = 180 + \frac{\tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \quad \text{se } a^* < 0$$

$$^{\circ}h = 360 + \frac{\tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{6,2832} \times 360, \quad \text{se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0$$

**Equações 8.5** | Conjunto de equações para a determinação do parâmetro  $^{\circ}h$ .

Segundo Bolin & Huxsoll (1991), o parâmetro WI traduz a maior ou menor presença de branco à superfície da amostra, de acordo com a seguinte equação (Equação 8.6):

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

**Equação 8.6** | Equação para determinação do parâmetro WI

Finalmente, o parâmetro DTC traduz as variações da cor entre uma dada amostra e uma amostra referência e cujas classificações encontram-se explicitadas na Tabela 8.1<sup>87</sup>. Este parâmetro indica a magnitude da diferença de cor entre amostras, facilitando a sua comparação<sup>84</sup>, e pode ser obtido através da seguinte expressão matemática (Equação 8.7):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

**Equação 8.7** | Equação para a determinação do parâmetro DTC. Os valores de  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  e  $b_0^*$  correspondem à média das leituras da cor no dia 0, usado como referência.

## Materiais e Métodos

**Tabela 8.1** | Classificação detalhada do nível de diferenças obtido através do DTC. Adaptado de Allegretti et al. (2009).

DTC	Grau de diferenças
0 – 0,2	Impercetível
0,2 – 0,5	Muito pequena
0,5 – 1,5	Pequena
1,5 – 3	Distinta
3 – 6	Muito distinta
6 – 12	Grande
> 12	Muito grande (cores diferentes)

### 8.9. Perfil fenólico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os extratos utilizados na determinação do perfil fenólico foram preparados a partir da mistura de 1:4 (p:v) de polpa de TV com metanol 100% e como descrito na secção 8.5. Antes da análise cromatográfica, a preparação das amostras foi finalizada com recurso a uma destilação simples (para evaporar o metanol) e a uma filtração (com recurso a filtros de 0,45 mm).

O perfil fenólico (e respetiva identificação dos picos) foi determinado através do método cromatográfico HPLC-PDA, segundo Barros et al. (2012), com algumas modificações. As determinações foram efetuadas à temperatura ambiente num sistema Alliance (Waters 2690 Separations Module, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com um detetor PDA (do inglês, *Photodiode array*) (Waters 996, Milford, Massachusetts, EUA), com recurso a uma coluna Spherisorb ODS2 C18, 5 µm (4.6 mm x 250 mm) (MZ Analysentechnik, Mainz, Alemanha). As fases móveis foram constituídas por 0,1% de ácido fórmico diluído em água (solvente A) e acetonitrilo (solvente B). As amostras e os padrões externos, cujo volume de injeção foi de 20 µL, foram eluídos segundo o gradiente: 0/10, 5/15, 10/25, 20/35, 25/50, 35/50, 40/10, 50/10 (min / % solvente B), sob um fluxo de 0,5 mL/min. A aquisição de dados foi realizada pelo *software* Waters Millennium 3.2 (Milford, Massachusetts, EUA), tendo-se obtido cromatogramas a 280 nm e 340 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e do espectro UV/Vis (190–600 nm) das amostras e dos padrões externos utilizados (ácidos gálico, clorogénico, p-cumárico, sinápico, t-cinâmico, ferúlico e p-hidroxibenzóico, rutina, quercetina, quercetina-3-b-D-glucósido e cianidina-3,5-di-O-glucósido).

### 8.10. Painel Sensorial

Para a avaliação das características organoléticas dos produtos fermentados, recorreu-se a um painel constituído por 10 provadores. As análises foram realizadas nas instalações da UTI–INIAV, em cabines individuais com luz branca, à temperatura ambiente, de acordo com as recomendações da norma ISO 13299:2016. Todos os fermentados de TV foram servidos em copos de vidro, codificados com três dígitos de forma aleatória. O teste utilizado segundo o método de escala hedónica considerou a avaliação das seguintes características: Cor, Aparência, Aroma, Consistência, Sabor, Homogeneidade e Apreciação Global, com recurso a uma escala crescente de 5 pontos<sup>90</sup>, onde o valor 1 representa o mínimo de apreciação correspondente a “desgostei muito”, 2 a “desgostei”, 3 a “não gostei nem desgostei”, 4 a “gostei” e 5 a “gostei muito”.

## Materiais e Métodos

Foi ainda pedido aos provadores para anotarem nas fichas de prova a descrição dos aromas apercebidos e as amostras mais e menos apreciadas. No Anexo C –, encontra-se exemplificada uma ficha de prova utilizada para uma das análises sensoriais.

### 9. Análise Estatística

---

A análise estatística foi efetuada através do *software* Statistica™ v8.0 (2007) da StatSoft Inc. As variáveis quantitativas (amostras independentes) foram comparadas através da análise de variância (one-way ou factorial ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias dos parâmetros medidos foram determinadas a  $p = 0,05$  através do teste Tukey's HSD. Recorreu-se também à correlação de Pearson para avaliar a relação entre CFT e AOx e entre os parâmetros colorimétricos.

### III. TRABALHO EXPERIMENTAL – DELINEAMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 9.1 encontra-se ilustrado um esquema da planificação geral dos ensaios realizados.

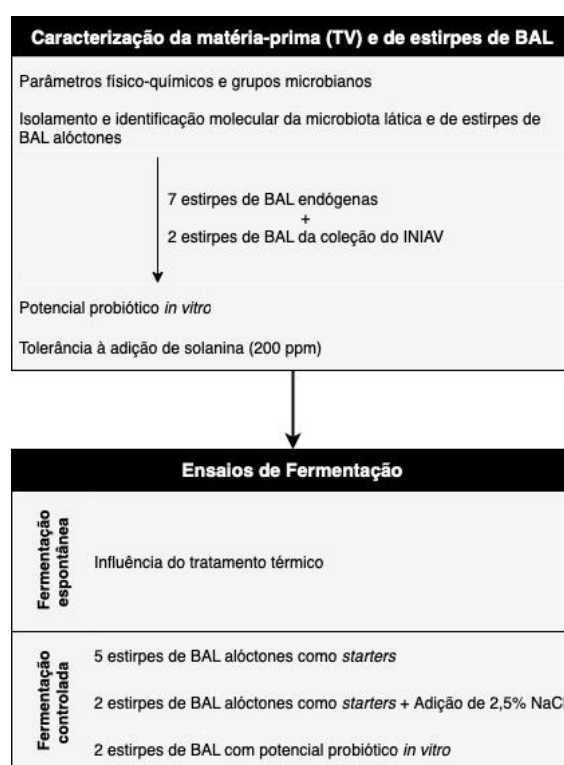


Figura 9.1 | Planificação geral dos ensaios.

## 10. Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

Nesta secção inicial, reúnem-se os resultados da caracterização físico-química e da avaliação dos grupos microbiológicos do TV; da identificação (bioquímica e genómica) de estirpes de BAL isoladas e caracterizadas da microbiota do TV e pertencentes à coleção do INIAV; e ainda do estudo dos respetivos potenciais probióticos *in vitro* e tolerância à adição de solanina.

### 10.1. Parâmetros físico-químicos e grupos microbianos

#### Metodologia

Foram caracterizados 3 tipos de amostras ( $\approx$  500 g cada), preparados em triplicado: amostras da categoria verde (Id: “Verde”), amostras da categoria intermédia (Id: “Intermédio”) e amostras constituídas pela mistura das anteriores, na proporção 1:1 (Id: “Mistura”). Esta última foi assim constituída por corresponder, em média, à distribuição relativa das duas categorias de frutos no campo (%). Os frutos foram homogeneizados (cf. 6.2) e as respetivas polpas foram

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

analisadas face ao teor de humidade, pH, AT, TSS, CFT, AOx e perfil fenólico. Na caracterização microbiológica dos frutos identificados como “Mistura”, foram avaliadas as contagens relativas a microrganismos a 30 °C, BAL, B&L, coliformes, *Staphylococcus coagulase positivas* e *E. Coli* (cf. 7.2).

### Teor de humidade, pH, AT, TSS, CFT e AOx

O teor de humidade, de ca. 92%, foi semelhante para todas as amostras, independentemente do estado de maturação dos frutos. O TSS das amostras “Verde” (6,2 °Brix) foi inferior ao das amostras “Intermédia” (6,9 °Brix), refletindo a diferença nos estados de maturação dos frutos. O TSS avaliado na “Mistura” (6,2 °Brix) resultou num valor semelhante ao das amostras “Verde”. As amostras “Verde” apresentaram valores de pH e AT de 4,2 e 0,87 g AL/100 g PF, respetivamente, enquanto as amostras “Intermédio” exibiram um pH = 4,1 e uma AT de 0,96 g AL/100 g PF. Estes parâmetros apresentaram variações mínimas entre amostras (ca. 0,1 unidades), refletindo, contudo, a diminuição do pH (e aumento da AT) das amostras “Verde” para “Intermédio”. Os resultados de pH e de AT para a “Mistura” (4,1 e 0,98 g AL/100 g PF, respetivamente) aproximaram-se dos resultados das amostras “Intermédio”. Os valores de CFT e AOx das amostras “Verde” (ca. 37 mg EAG/100 g PF e ca. 694 µmol ET/100 g PF, respetivamente) foram significativamente inferiores aos valores obtidos para as amostras “Intermédio” (ca. 47 mg EAG/100 g PF e ca. 1443 µmol ET/100 g PF, respetivamente). Os resultados destes parâmetros para a “Mistura” foram intermédios (ca. 41 mg EAG/100 g PF e ca. 1018 µmol ET/100 g PF, respetivamente).

O tomate, independentemente do estado de maturação e da variedade, apresenta, normalmente, valores elevados de humidade, na gama de 90–95% de água<sup>17</sup>, tal como os resultados das amostras testadas. Para os restantes parâmetros físico-químicos, são reportados valores variáveis consoante a variedade (Tabela 10.1). Os valores obtidos para o pH e a AOx encontram-se próximos dos reportados, enquanto os valores obtidos para os restantes parâmetros (TSS, AT e CFT) foram superiores aos referidos na literatura. De salientar ainda que a possível razão pelo aumento de AOx das amostras “Verde” para as amostras “Intermédio” é a maior quantidade de licopeno (composto que contribui positivamente para a AOx) em frutos com estados de maturação mais avançados (categoria intermédia).

**Tabela 10.1** | Valores reportados na literatura para os parâmetros TSS, pH, AT, CFT e AOx, em TV (categoria verde).

Parâmetro	Variedade	Referência	
TSS (°Brix)	4,4	Zinac	Pinheiro et al. (2013) <sup>92</sup>
	4,9	San Marzano	Pataro et al. (2015) <sup>93</sup>
	5,0	Raísa e Santa Clara	Ferreira et al. (2010) <sup>94</sup>
	3,6 – 4,6	Sakura, Sunstream e Mathew	Duma et al. (2015) <sup>95</sup>
pH	4,2	Zinac	Pinheiro et al. (2013) <sup>92</sup>
	3,9	San Marzano	Pataro et al. (2015) <sup>93</sup>
	4,2	Raísa e Santa Clara	Ferreira et al. (2010) <sup>94</sup>
AT (g/100g ácido cítrico)	0,5 – 0,7	Sakura, Sunstream e Mathew	Duma et al. (2015) <sup>95</sup>

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

Parâmetro		Variedade	Referência
CFT (mg EAG/100g)	25,4	Zinac	Pinheiro et al. (2013) <sup>92</sup>
	21,1	Zinac	Pinheiro et al. (2009) <sup>96</sup>
	26,7	San Marzano	Pataro et al. (2015) <sup>93</sup>
AOx ( $\mu$ mol ET/100g)	706,45 $\pm$ 27,80	Zinac	Pinheiro et al. (2009) <sup>96</sup>

Diversos estudos realizados em diferentes matrizes vegetais têm reportado uma correlação positiva entre CFT e AOx, pelo que os compostos fenólicos são usualmente apontados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos HF<sup>97-99</sup>. Por este motivo, a avaliação do CFT é, normalmente, considerada um método fiável para prever a AOx *in vitro*<sup>100</sup>. Contudo, a contribuição dos compostos fenólicos na AOx ainda não se encontra totalmente esclarecida<sup>98,101</sup>, sabendo-se apenas que a expressão da AOx pode ser uma consequência do efeito sinérgico entre vários compostos fenólicos, não devendo ser atribuída especificamente a um único composto<sup>102</sup>.

Portanto, foi ainda estudada a relação entre o CFT e a AOx das amostras (Tabela VI.1, Anexo D –), tendo-se obtido uma correlação positiva elevada entre os parâmetros:  $r = 1,00$  ( $p < 0,05$ ) para as amostras “Verde” e “Mistura” e  $r = 0,89$  ( $p > 0,05$ ) para as amostras “Intermédio”. Desta forma, concluiu-se que a AOx das amostras se deve, em grande parte, à composição fenólica, independentemente da fase de maturação dos frutos. Contudo, para além dos polifenóis, existem outros compostos que podem contribuir para a AOx das amostras, entre eles vitaminas antioxidantes (como o ácido ascórbico) e carotenoides (nomeadamente, licopeno e  $\beta$ -caroteno)<sup>103,104</sup>. A crescer, a existência de efeitos sinérgicos ou antagónicos entre os diversos compostos fenólicos pode também influenciar significativamente a AOx<sup>105</sup>.

Existem estudos contraditórios sobre a relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de diversos HF<sup>104</sup>: apesar da maioria dos estudos observarem uma elevada correlação entre os dois parâmetros<sup>97,106,107</sup>, há autores que reportam uma fraca correlação<sup>103</sup> ou a inexistência de uma correlação direta<sup>108</sup>. Em particular, Fuentes et al. (2013) reportaram uma correlação positiva e significativa entre CFT e AOx determinada pelo método DPPH ( $r = 0,99$ ) tanto para tomate maduro como para tomate verde. Resultados semelhantes foram igualmente reportados para extratos de tomate de diferentes variedades, onde também se verificou uma correlação positiva entre o CFT e a AOx, com valores de  $r = 0,94$ <sup>110</sup>,  $r = 0,73$ <sup>111</sup> e  $r = 0,84$ <sup>112</sup>.

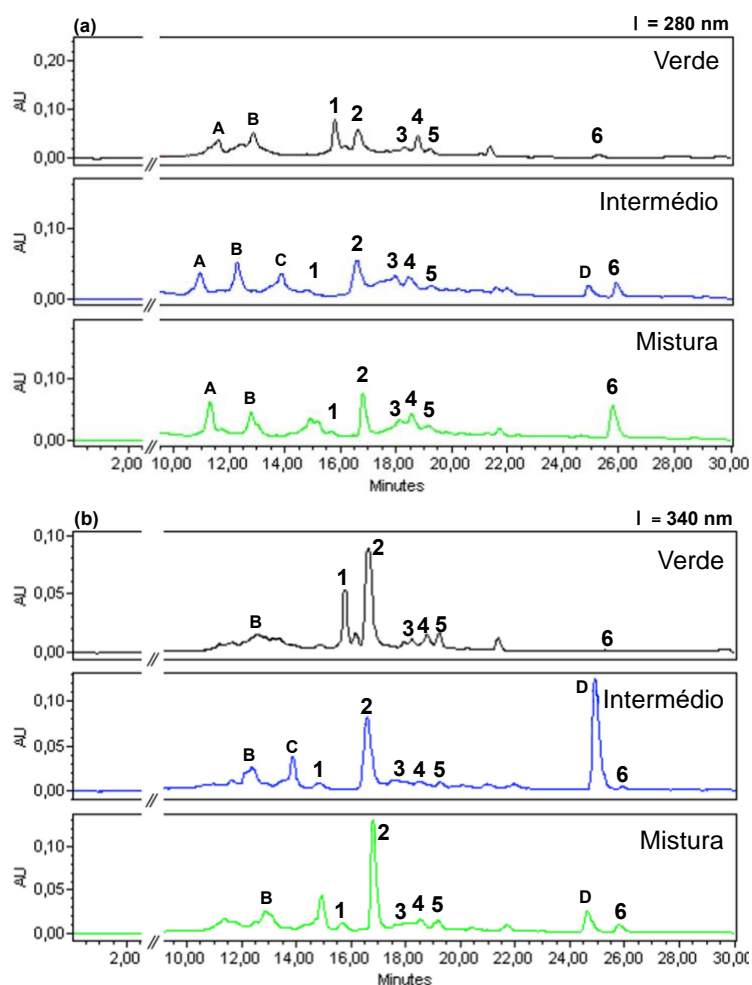
### Perfil fenólico

Na avaliação sumária do perfil fenólico (Figura 10.1), foram detetados 6 compostos, comuns a todas as amostras, classificados em duas classes: ácidos fenólicos e flavonoides. Entre os ácidos fenólicos, destacou-se a prevalência dos ácidos hidroxicinâmicos como os ácidos clorogénico (pico 1), *p*-cumárico (pico 4) e ferúlico (pico 5). Relativamente aos flavonoides, foram identificados compostos pertencentes a dois grupos: flavonóis e flavanonas. Entre os flavonóis, foram sempre identificados os compostos rutina (pico 2) e quercetina-3- $\beta$ -D-glucósido (pico 3). Foram ainda encontrados outros flavonóis glucosilados não identificados, suspeitos de formas

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

glucosiladas de quercetina e de kaempferol (15 min <  $t_R$  < 23 min). A ( $\pm$ )-naringenina (pico 6) foi a única flavanona identificada nos três tipos de amostra analisadas. Verificou-se ainda a presença de outros compostos não identificados, mas cujos espectros UV-Vis permitiram qualificá-los como derivados de ácidos fenólicos (picos A, C e D) e derivado de catequina (pico B; flavan-3-ol). Todos os compostos referidos (picos 1–6) foram identificados nos três tipos de amostra, porém são expectáveis variações no respetivo conteúdo em função do tipo de amostras. A título exemplificativo, a presença de ácido clorogénico (pico 1) foi mais evidente na amostra “Verde” face às amostras “Intermédio” e “Mistura” (tomando a altura ou área do pico). À semelhança, os quantitativos relativos ao composto ( $\pm$ )-naringenina (pico 6) mostraram diferenças entre amostras, com picos mais expressivos nas amostras “Intermédio” e “Mistura” comparativamente à amostra “Verde”.

De acordo com a literatura, o ácido clorogénico apresenta-se como o principal e mais estudado composto fenólico do tomate<sup>113–116</sup>, enquanto os flavonoides são representados pelas flavanonas (derivados de naringenina glucosilados) e flavonóis (derivados de quercetina, rutina e kaempferol glucosilados)<sup>114,117–120</sup>. Face ao exposto, a avaliação sumária do perfil fenólico das amostras de TV analisadas foi concordante com os estudos referidos.



**Figura 10.1** | Cromatogramas de HPLC-DAD para as amostras “Verde”, “Intermédio” e “Mistura” a (a)  $\lambda = 280$  nm e (b)  $\lambda = 340$  nm. Identificação dos picos: 1 - ácido clorogénico; 2 - rutina; 3 - quercetina-3- $\beta$ -D-glucósido; 4 - ácido *p*-cumárico; 5 - ácido ferúlico; 6 - ( $\pm$ )-naringenina; A, C e D – derivados de ácidos fenólicos não identificados; B – derivado de catequina (flavan-3-ol) não identificado.

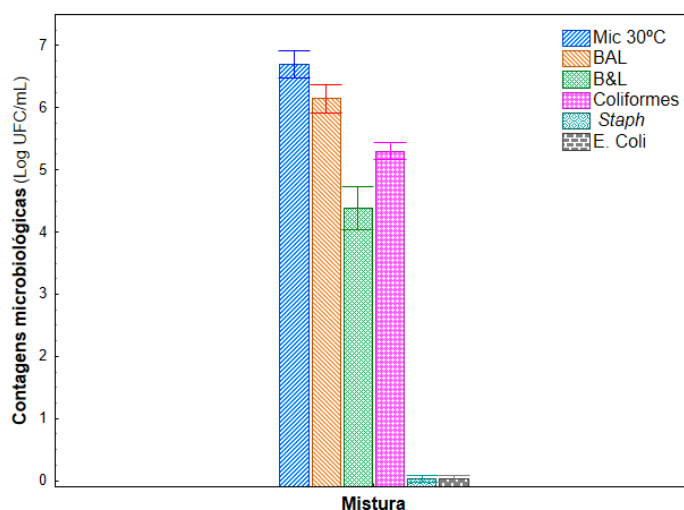
## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

### Contagens microbiológicas

As contagens médias de cada grupo microbiológico avaliado (microrganismos a 30 °C, BAL, B&L, coliformes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. Coli*) encontram-se ilustradas na Figura 10.2.

Para a amostra “Mistura” analisada, a contagem das populações de microrganismos a 30 °C, BAL e B&L exibiu níveis médios (ca. 6,7, 6,1 e 4,4 log UFC/mL, respetivamente). Foram igualmente contabilizados níveis médios de coliformes, ca. 5,3 log UFC/mL. Os grupos *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. Coli* não foram detetados na amostra analisada, conferindo segurança microbiológica à matriz vegetal.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) estabeleceu valores guia para as contagens de diversos grupos microbiológicos, consoante o género alimentício<sup>121</sup>. No caso dos HF (Grupo 3), as contagens microbianas não devem exceder 6–8 log UFC/mL para microrganismos a 30 °C, 3–6 log UFC/mL para B&L, 2–4 log UFC/mL para coliformes e 1–2 log UFC/mL para *Staphylococcus* coagulase positiva. Por outro lado, não devem ser detetados quaisquer níveis de *E. Coli* para garantir um nível de qualidade microbiológica satisfatório.



**Figura 10.2** | Contagens médias dos grupos microbiológicos: microrganismos a 30 °C, BAL, B&L, coliformes, *Staphylococcus* coagulase positivas e *E. Coli*, para a amostra “Mistura” de frutos. As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

### Considerações intercalares

- A mistura de ambas as categorias, na proporção 1:1, será usada como substrato fermentativo porque, para além de refletir a distribuição relativa dos frutos desaproveitados no campo, os respetivos parâmetros físico-químicos não diferem de forma expressiva face aos das amostras “Verde” e “Intermédio”.
- Os níveis de microrganismos a 30 °C, BAL, B&L e coliformes contabilizados na amostra “Mistura” refletem valores aceitáveis, eliminando, assim, a hipótese de contaminação elevada dos frutos desaproveitados. Por outro lado, a ausência de microrganismos patogénicos (*Staphylococcus* coagulase positiva e *E. Coli*) reforça a possibilidade de valorização alimentar destes frutos.

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

## 10.2. Caracterização e identificação molecular da microbiota láctica

### Objetivo

- Isolar, caracterizar e identificar a microbiota láctica predominante do TV, com vista à utilização de estirpes de BAL autóctones como CS na produção de fermentados desta matriz.
- Confirmar a identificação de 9 estirpes de BAL selecionadas, das quais 2 pertencem à coleção bacteriana do INIAV (C244 e C1090) e as restantes 7 são autóctones, previamente isoladas (BAL40, BAL49, BAL89, BAL82, BAL67, BAL97 e BAL94), através da sequenciação do fragmento genómico 16S rDNA.

### Metodologia

Homogeneizados de TV (cf. 6.2), previamente preparados, foram diluídos em série em triptona sal e, posteriormente, incubados em meio MRS agar à temperatura de 30 °C durante 72 h em condições anaeróbias. Por avaliação do perfil fenotípico, selecionaram-se diversas colónias bacterianas, que foram purificadas em meio MRS líquido e incubadas a 30 °C durante 48 h. Por fim, as colónias isoladas foram conservadas sob congelação (–80 °C; cf. 7.4) até posterior análise. As culturas puras de BAL isoladas foram caracterizadas através de um exame a fresco (observação microscópica da sua morfologia), do teste da catalase e do teste de KOH e identificadas através do método API (cf. 7.5). De salientar que, aquando da realização destes testes de caracterização, as estirpes congeladas foram previamente revitalizadas através de sucessivas repicagens em meio MRS líquido (cf. 7.4).

A partir de colónias bacterianas isoladas de cada estirpe, extraiu-se o respetivo DNA segundo o protocolo fornecido pela empresa StabVida, à qual se seguiu a respetiva amplificação por PCR. A posterior sequenciação e determinação da sequência consensus de cada estirpe possibilitou a respetiva identificação molecular (cf. 7.5.5).

### Perfil fenotípico e bioquímico de estirpes de BAL autóctones

A partir da observação macroscópica das estirpes constituintes da microbiota láctica do TV, foram isoladas, pelas suas características fenotípicas distintas, 55 estirpes de BAL. Estas estirpes foram posteriormente caracterizadas e identificadas. Os resultados da caracterização efetuada através do exame a fresco, do teste da catalase e do teste de KOH são apresentados na Tabela VI.2 (Anexo E –). Morfologicamente, foi possível concluir que a maioria das estirpes caracterizadas apresentaram a forma de bastonetes ( $\approx 75\%$ ), variando na sua largura, tamanho e forma de agregação. Para além de bastonetes, foram igualmente observados *Lactococcus* ( $\approx 25\%$ ), com diferenças ao nível do tamanho e forma de agregação. Através dos testes da catalase e do KOH (resultados negativos), concluiu-se que todas as estirpes isoladas eram catalase-negativa e Gram-positivas, correspondendo aos perfis característicos das BAL.

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

### Identificação bioquímica das estirpes bacterianas (método API)

Os resultados obtidos pelo método API (Tabela VI.3, Anexo E –) revelaram diferentes padrões fermentativos, o que indicia uma diversidade da microbiota láctica do TV. Apesar dos diversos padrões fermentativos, D-glucose, D-frutose, D-manose, N-acetil-glucosamina, esculina e celobiose foram os hidratos de carbono mais fermentados pela maioria das estirpes (> 90% das estirpes fermentaram estes hidratos de carbono).

Para a identificação de cada estirpe bacteriana (Tabela 10.3), possibilitada pela introdução destes conjuntos de resultados no *software apiweb*<sup>TM</sup>, foi atribuído, segundo os critérios da BioMérieux, um grau de fiabilidade consoante a percentagem de identificação, cujos intervalos se encontram explicitados na Tabela 10.2.

**Tabela 10.2** | Graus de fiabilidade para as percentagens de identificação obtidas pelo método API (BioMérieux S.A, Marcy L'Etoile, França).

Intervalo de % identificação	Classificação
< 80 %	Fraca discriminação
≥ 80 % e < 90 %	Identificação aceitável
≥ 90 % e < 99 %	Boa identificação
≥ 99 % e < 99,9 %	Muito boa identificação
≥ 99,9 %	Excelente identificação

**Tabela 10.3** | Identificação sugerida pelo método API 50 CHL para as estirpes isoladas, com as respetivas percentagens de identificação e classificações.

Isolados	Espécie	% identificação	Classificação
BAL39	<i>Weissella confusa</i>	59,9	Fraca discriminação
BAL40	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL41	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL42	<i>Weissella confusa</i>	99,6	Muito boa identificação
BAL43	<i>Weissella confusa</i>	96,6	Boa identificação
BAL44	<i>Lactobacillus brevis</i>	62,6	Fraca discriminação
BAL45	<i>Lactococcus lactis</i>	73,9	Fraca discriminação
BAL46	<i>Weissella confusa</i>	62,5	Fraca discriminação
BAL47	<i>Weissella confusa</i>	83,4	Identificação aceitável
BAL48	<i>Weissella confusa</i>	83,4	Identificação aceitável
BAL49	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL50	<i>Weissella confusa</i>	95,0	Boa identificação
BAL51	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,8	Boa identificação
BAL52	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL53	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL54	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL55	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL56	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL57	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL58	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL59	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	90,4	Boa identificação
BAL61	<i>Lactobacillus paracasei</i>	52,9	Fraca discriminação
BAL62	<i>Weissella confusa</i>	96,6	Boa identificação
BAL63	<i>Weissella confusa</i>	96,6	Boa identificação

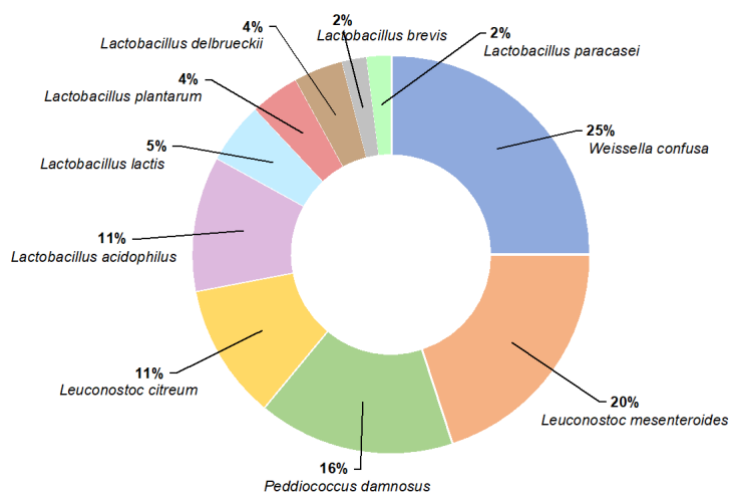
## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

Isolados	Espécie	% identificação	Classificação
BAL64	<i>Weissella confusa</i>	96,6	Boa identificação
BAL65	<i>Weissella confusa</i>	96,6	Boa identificação
BAL66	<i>Pediococcus damnosus</i>	97,5	Boa identificação
BAL67	<i>Lactococcus lactis</i>	99,9	Excelente identificação
BAL68	<i>Lactococcus lactis</i>	99,9	Excelente identificação
BAL69	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,5	Boa identificação
BAL70	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	93,6	Boa identificação
BAL75	<i>Leuconostoc citreum</i>	63,3	Fraca discriminação
BAL76	<i>Leuconostoc citreum</i>	99,9	Excelente identificação
BAL77	<i>Leuconostoc citreum</i>	99,9	Excelente identificação
BAL78	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	58,7	Fraca discriminação
BAL79	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL80	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	58,2	Fraca discriminação
BAL81	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	68,4	Fraca discriminação
BAL82	<i>Leuconostoc citreum</i>	99,9	Excelente identificação
BAL83	<i>Weissella confusa</i>	98,1	Boa identificação
BAL84	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL85	<i>Leuconostoc citreum</i>	63,3	Fraca discriminação
BAL86	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	90,4	Boa identificação
BAL87	<i>Weissella confusa</i>	99,6	Muito boa identificação
BAL88	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99,9	Excelente identificação
BAL89	<i>Weissella confusa</i>	99,9	Excelente identificação
BAL90	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	86,7	Identificação aceitável
BAL91	<i>Leuconostoc citreum</i>	87,7	Identificação aceitável
BAL92	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	58,7	Fraca discriminação
BAL93	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	74,1	Fraca discriminação
BAL94	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	74,7	Fraca discriminação
BAL95	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	74,1	Fraca discriminação
BAL96	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Excelente identificação
BAL97	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	Excelente identificação

Para a maioria das estirpes, o método API revelou, no mínimo, uma boa identificação (identificação > 90 %), tendo apenas 14 estirpes sido identificadas com fraca discriminação. Esta identificação comprovou a diversidade microbiana da microbiota láctica do TV, da qual fazem parte as espécies *W. confusa* (25%), *L. mesenteroides* (20%), *P. damnosus* (16%), *L. citreum* (11%), *L. acidophilus* (11%), *L. lactis* (5%), *L. plantarum* (4%), *L. delbrueckii* (4%), *L. brevis* (2%) e *L. paracasei* (2%) (Figura 10.3). Desta forma, confirmou-se que os géneros de BAL predominantes no TV são *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Weissella*.

Em amostras de TV fermentado espontaneamente, a maioria das estirpes isoladas foram identificadas como *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *W. confusa*, *L. casei* e *L. citreum*<sup>122,123</sup>. Já em sumo de tomate, as estirpes autóctones isoladas da matéria-prima foram caracterizadas como bastonetes e coccus imóveis, Gram-positivos e catalase-negativos, tal como no presente estudo. Estas foram posteriormente identificadas como *L. plantarum*, *W. confusa*, *L. brevis*, *W. cibaria* e *P. pentosaceus*<sup>44</sup>.

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL



**Figura 10.3** | Predominância das diferentes espécies de BAL isoladas da microbiota do TV.

Na identificação de microrganismos através deste método, são referidas algumas limitações que podem afetar a fiabilidade dos resultados obtidos, nomeadamente a exigência de utilização de culturas puras, o que nem sempre é possível assegurar. Em consequência, a fraca discriminação na identificação de algumas estirpes pode ser justificada por este motivo. Por outro lado, o facto do método API 50 CHL identificar unicamente as espécies de *Lactobacillus* (e géneros relacionados) incluídas na base de dados utilizada limita a possibilidade de identificação de outros tipos de microrganismos, não se podendo excluir a sua presença<sup>75</sup>.

Com base nestes resultados, e tendo em consideração as espécies mais frequentemente reportadas na literatura como responsáveis pela fermentação espontânea do TV, foram selecionadas 7 estirpes de BAL autóctones (Tabela 10.4) para confirmar a sua identificação e testar o potencial probiótico *in vitro* e a tolerância à solanina. Este conjunto de estirpes foi constituído pelas espécies mais predominantes (frequência de isolamento superior a 10%), com exceção de *L. lactis* e *L. plantarum*, cujo critério de seleção se baseou na sua utilização abrangente como CS na indústria alimentar<sup>124</sup>. Para além destas, foram igualmente selecionadas duas estirpes de BAL pertencentes à coleção bacteriana do INIAV – C244 e C1090 (Tabela 10.4) – por apresentarem, em ensaios preliminares, capacidade em fermentar a matriz TV (elevado desenvolvimento microbiano e variações de pH significativas face às restantes estirpes testadas; dados não apresentados).

**Tabela 10.4** | Conjunto de estirpes de BAL selecionadas.

Origem	Estirpes	Espécies
	BAL40	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	BAL49	<i>Pediococcus damnosus</i>
	BAL67	<i>Lactococcus lactis</i>
Autóctone	BAL82	<i>Leuconostoc citreum</i>
	BAL89	<i>Weissella confusa</i>
	BAL94	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	BAL97	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Coleção do INIAV	C244	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	C1090	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

### Identificação molecular das estirpes de BAL selecionadas

A introdução das sequências consensus de cada estirpe na ferramenta bioinformática BLAST possibilitou, por comparação com as sequências registadas na base de dados NCBI, a identificação das estirpes estudadas com uma fiabilidade superior a 99,9%. A percentagem de identificação, a pontuação máxima e os valores de *query cover* (percentagem da sequência consensus coberta pela sequência alvo) e de *E-value* (indicativo do número de vezes que ocorre um *match* por sorte) foram os critérios utilizados para atribuir as espécies sugeridas (Tabela 10.5).

**Tabela 10.5** | Espécies sugeridas pelas sequências consensus de cada estirpe depois de introduzidas na ferramenta BLAST e confrontadas com a base de dados de NCBI. Estão indicadas as percentagens de identificação, a pontuação máxima, o *query cover*, o *E-value* e o número de acesso da espécie na base de dados NCBI.

Estirpes	Espécie	% identificação	Pontuação máxima	Query cover (%)	E-value	Número de acesso (NCBI)
BAL40	<i>Weissella cibaria</i>	100	2599	100	0,0	OL405452
BAL49	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100	2588	100	0,0	OL405451
BAL67	<i>Lactococcus lactis</i>	100	2503	100	0,0	OL405455
BAL82	<i>Leuconostoc citreum</i>	100	2549	100	0,0	OL405449
BAL89	<i>Weissella cibaria</i>	100	2597	100	0,0	OL405450
BAL94	<i>Weissella confusa</i>	100	2593	100	0,0	OL405453
BAL97	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	100	2569	100	0,0	OL405454
C244	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	99,93	2571	100	0,0	OL405447
C1090	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100	2536	100	0,0	OL405448

As espécies identificadas por sequenciação genómica pertencem aos géneros *Lactiplantibacillus* (= *Lactobacillus*), *Weissella*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, tal como identificado através do método API. Foi realizada ainda uma eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR (Figura VI.8, Anexo F –) para comprovar o tamanho dos produtos amplificados e, assim, verificar a correta amplificação de todas as amostras.

O método API e a sequenciação do fragmento genómico 16S rDNA sugeriram diferentes espécies na identificação de algumas estirpes. Embora apresente uma nomenclatura diferente devido à atualização das chaves taxonómicas, a identificação das estirpes BAL97, C244 e C1090 foi idêntica. No caso particular da estirpe BAL89, houve uma concordância entre ambos os métodos na identificação do género da estirpe, diferindo apenas na identificação da espécie. As identificações das estirpes BAL40, BAL49 e BAL94 foram as únicas que diferiram totalmente entre os métodos de identificação utilizados. Para estas estirpes, a possibilidade das colónias bacterianas não estarem bem isoladas pode ter influenciado o resultado obtido na identificação pelo método API e, por consequência, originado as diferenças observadas.

Em diversos estudos, foi igualmente reportada uma discrepância na identificação bacteriana entre o método API e a sequenciação genómica<sup>125–127</sup>. A perda ou ganho de plasmídeos é apontada como uma das principais razões para a discrepância entre os resultados bioquímicos e os genómicos, isto porque alguns genes necessários para a fermentação de açúcares são codificados por plasmídeos, pelo que a variação no conteúdo plasmídico pode resultar em inconsistências metabólicas<sup>126,128</sup>. Independentemente das vantagens e desvantagens dos métodos de identificação, as técnicas moleculares são importantes para

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

comprovar as análises bioquímicas obtidas pelo método API<sup>127</sup> dada a sua maior eficácia na identificação das espécies bacterianas<sup>127,129</sup>.

### Considerações intercalares

- Foram isoladas e identificadas 55 estirpes de BAL no TV pertencentes, predominantemente, aos géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Weissella*, confirmando a diversidade da microbiota láctica com capacidade de fermentar o substrato.
- A sequenciação genómica das estirpes selecionadas demonstrou uma maior eficácia na identificação das espécies bacterianas.
- Apesar da existência de algumas discrepâncias na identificação entre o método API e a sequenciação genómica, as estirpes selecionadas continuam a pertencer, predominantemente, aos géneros *Lactiplantibacillus*, *Weissella* e *Leuconostoc*.

### 10.3. Potencial probiótico *in vitro*

#### Objetivo

Averiguar, preliminarmente, o potencial probiótico das 9 estirpes de BAL identificadas molecularmente (C244, C1090, BAL40, BAL49, BAL89, BAL82, BAL67, BAL94 e BAL97), através da mimetização do trato gastrointestinal *in vitro*.

#### Metodologia

O desenvolvimento das estirpes previamente selecionadas (C244, C1090, BAL40, BAL49, BAL89, BAL82, BAL67, BAL94 e BAL97) foi analisado em dois meios de cultura: MRS e mistura de polpa de TV, previamente homogeneizada, com água destilada, na proporção 1:1 (Id: TV). Ambos os meios foram esterilizados (autoclavados a 115 °C durante 5 minutos) e preparados segundo as seguintes condições:

- S1 – Simulação de condições gástricas: Meio com 2,5% NaCl e pH = 2,5 (ajustado com HCl 33%), incubado a 37 °C durante 3 h;
- S2 – Simulação de condições intestinais: Meio com 0,3% sais biliares, incubado a 37 °C durante 4 h.

Foi ainda testado o desenvolvimento das estirpes em condições controlo (sem quaisquer adições e ajustes de pH) para ambos os meios de cultura.

As amostras, preparadas em 9 mL de cada meio (triplicado), foram inoculadas com 1 mL da respetiva estirpe para cada uma das condições (concentração inicial de 8 log UFC/mL), o que resultou num total de 6 amostras por estirpe (3 para cada meio). Estas foram posteriormente mantidas nas condições S1 e S2, tendo sido retiradas alíquotas no tempo 0 e no final dos respetivos períodos para contagem de BAL (log UFC/mL; cf. 7.2.1). No caso das amostras controlo, foram retiradas alíquotas no tempo 0 e ao final de 3 e 4 h de incubação.

#### Apresentação e Discussão de Resultados

As contagens de BAL, em ambos os meios (MRS e TV) e para cada condição de simulação (S1 e S2), estão apresentadas na Tabela 10.6.

Durante a condição S1, nenhuma das estirpes testadas em meio MRS resistiu ao pH ácido, com exceção da estirpe BAL89, cujas contagens foram de ca. 2 log UFC/mL. Por outro lado, na condição S2, todas as estirpes apresentaram contagens elevadas (> 7 log UFC/mL), demonstrando, assim, que, em meio MRS, a adição de sais biliares não influenciou o desenvolvimento das BAL. Em meio TV, apenas as estirpes BAL89, BAL82 e BAL67 não resistiram ao pH ácido a simular as condições gástricas. As restantes estirpes foram capazes de se desenvolver nestas condições, com particular destaque para as estirpes C1090 e BAL97, uma vez que foram as únicas a alcançarem contagens > 7 log UFC/mL. Durante a simulação das condições intestinais, as estirpes BAL40, BAL89, BAL82, BAL67 e BAL94 não resistiram à adição de sais biliares, enquanto as restantes estirpes foram capazes de se desenvolver nestas condições, com particular destaque, novamente, para as estirpes C1090 e BAL97, que alcançaram contagens de ca. 7 log UFC/mL.

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

Para exibirem potencial probiótico *in vitro*, as estirpes bacterianas necessitam de resistir, em simultâneo, a ambas as condições e manter contagens  $\geq 7$  log UFC/mL, pelo que apenas as estirpes C1090 (*W. paramesenteroides* alóctone) e BAL97 (*L. plantarum* autóctone) exibiram essa capacidade. As estirpes C244 e BAL49 (*L. plantarum* alóctone e autóctone, respetivamente), embora não tenham alcançado as referidas contagens bacterianas, poderão ser novamente testadas tendo em conta a respetiva tolerância às condições S1 e S2 em simultâneo.

Na condição “controlo” (Tabela VI.4, Anexo G –), independentemente da estirpe testada e do meio de cultura, foram contabilizadas contagens  $> 7$  log UFC/mL para todas as amostras durante todo o período testado. De salientar ainda que as contagens microbianas para todas as estirpes testadas foram semelhantes nos dois tipos de meio (não ultrapassando 1 ciclo log entre ambos), demonstrando a adequação do meio de TV. Estes resultados confirmaram a viabilidade das estirpes, garantindo a ausência de quaisquer fatores de inibição ao desenvolvimento microbiano para além das condições de simulação S1 e S2.

**Tabela 10.6** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) das contagens de BAL iniciais ( $t = 0$ ) e ao fim dos tempos de incubação ( $t = 3$  h para S1 e  $t = 4$  h para S2) para todas as estirpes em meio MRS e em meio TV.

Amostra	Estirpe	Origem	Meio	Condição	Contagem inicial (log UFC/mL)	Contagem final (log UFC/mL)	Potencial probiótico
C244	<i>L. plantarum</i>	Coleção	MRS	S1	7,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	-
				S2	8,0 ± 0,2	7,2 ± 0,4	+
C1090	<i>W. paramesenteroides</i>	Coleção	MRS	S1	7,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,9 ± 0,0	8,7 ± 0,0	+
BAL40	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	MRS	S1	1,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	+
BAL49	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	MRS	S1	9,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
				S2	9,5 ± 0,0 *	8,8 ± 0,1	+
BAL67	<i>L. lactis</i>	Autóctone	MRS	S1	7,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,0 ± 0,0	9,5 ± 0,0 *	+
BAL82	<i>L. Citreum</i>	Autóctone	MRS	S1	5,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	-
				S2	9,4 ± 0,3	7,9 ± 0,1	+
BAL89	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	MRS	S1	6,6 ± 0,2	2,2 ± 0,0	-
				S2	7,7 ± 0,1	9,5 ± 0,0 *	+
BAL94	<i>W. confusa</i>	Autóctone	MRS	S1	7,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,7 ± 0,1	8,2 ± 0,2	+
BAL97	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	MRS	S1	7,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,7 ± 0,0	8,3 ± 0,0	+
C244	<i>L. plantarum</i>	Coleção	TV	S1	7,9 ± 0,1	4,2 ± 0,2	-
				S2	7,9 ± 0,0	6,1 ± 0,1	+
C1090	<i>W. paramesenteroides</i>	Coleção	TV	S1	7,8 ± 0,1	9,5 ± 0,0 *	+
				S2	7,2 ± 0,2	6,8 ± 0,2	+
BAL40	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	TV	S1	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,7	-
				S2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

Amostra	Estirpe	Origem	Meio	Condição	Contagem inicial (log UFC/mL)	Contagem final (log UFC/mL)	Potencial probiótico
BAL49	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	TV	S1	9,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	-
				S2	9,5 ± 0,1	9,5 ± 0,0 *	+
BAL67	<i>L. lactis</i>	Autóctone	TV	S1	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
				S2	6,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	-
BAL82	<i>L. Citreum</i>	Autóctone	TV	S1	9,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
				S2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
BAL89	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	TV	S1	6,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	-
				S2	7,7 ± 0,0	4,0 ± 0,0	-
BAL94	<i>W. confusa</i>	Autóctone	TV	S1	6,2 ± 0,4	1,4 ± 0,2	-
				S2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
BAL97	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	TV	S1	7,4 ± 0,0	7,5 ± 0,1	+
				S2	6,1 ± 0,3	6,9 ± 0,3	+

Segundo o critério que dita 7 log UFC/mL como a quantidade mínima de BAL para a estirpe apresentar potencial probiótico, “-“ indica que a estirpe não cumpriu este requisito na condição testada e “+” indica que a estirpe resistiu à condição testada com elevado desenvolvimento.

\* Indica as situações em que as colónias foram incontáveis à diluição realizada ( $10^{-2}$  no caso da simulação das condições gástricas e  $10^{-5}$  no caso da simulação das condições intestinais). Assumiu-se, portanto, um valor superior a 9 log UFC/mL.

A acidez (pH ≈ 2,5) e a presença de sais biliares no trato gastrointestinal constituem as principais condições de inibição ao desenvolvimento de espécies bacterianas aquando da ingestão de alimentos<sup>130</sup>. Portanto, é essencial que os microrganismos com potencial probiótico sejam capazes de tolerar as condições ácidas no estômago e a presença dos sais biliares no intestino delgado e manter a respetiva viabilidade, para que possam posteriormente sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal<sup>131</sup>.

Existem múltiplos estudos dedicados à avaliação das características probióticas (nomeadamente a resistência ao pH baixo e aos sais biliares) de um extenso conjunto de espécies bacterianas, principalmente pertencentes aos géneros *Lactiplantibacillus*, *Weisella*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Tal como neste estudo (C1090 da coleção do INIAV), Paula et al. (2014) e Sathyapriya & Anitha (2019) reportaram a capacidade de tolerância de *W. paramesenteroides* a condições simuladas do trato gastrointestinal (pH baixo e presença de sais biliares) sem alteração da sua viabilidade, demonstrando, assim, o seu potencial probiótico. Por outro lado, para o género *Lactiplantibacillus*, são referidas diversas espécies com potencial probiótico comprovado, pelo que não é de estranhar que a estirpe BAL97 (*L. plantarum* autóctone) tenha exibido esta capacidade. Acresce ainda que as espécies *L. plantarum* e *L. lactis* são frequentemente referenciadas quer por resistir a condições adversas do trato gastrointestinal, como por exibirem outras características probióticas<sup>131,134–137</sup>.

### Considerações intercalares

- De entre as 9 estirpes de BAL testadas, apenas as estirpes C1090 e BAL97 apresentaram potencial probiótico *in vitro* em meio TV, por terem sido capazes de

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

resistir simultaneamente às condições de pH ácido e presença de sais biliares, mantendo contagens superiores a 7 log UFC/mL.

- Para comprovar estas estirpes como probióticas, terão de ser realizados mais estudos para avaliação de outras características, nomeadamente a capacidade de adesão das estirpes às células epiteliais do intestino, a tolerância a enzimas pancreáticos, a hidrofobicidade da superfície celular e a auto-agregação celular. A confirmação do caráter probiótico das estirpes bacterianas inclui ainda a avaliação da segurança das estirpes (atividade hemolítica, suscetibilidade a antibióticos, atividade antimicrobiana e antagonista) e, em continuidade, a realização de estudos *in vivo* para comprovar os potenciais benefícios para a saúde dos fermentados.

## 10.4. Tolerância à adição de solanina

### Objetivo

A presença de glicoalcaloides no TV, nomeadamente de solanina, pode levantar questões de segurança alimentar, tendo em conta a toxicidade associada a estes compostos. Segundo o *Nordic Group on Risk Assessment and Food Toxicology*, o teor de glicoalcaloides admitido para consumo alimentar é de 200 ppm<sup>33</sup>. Na elaboração deste ingrediente alimentar, a presença de glicoalcaloides na matéria-prima pode ainda ser considerado problemático uma vez que estes compostos podem inibir o desenvolvimento das BAL<sup>34</sup> e, assim, comprometer a fermentação. No entanto, e em sentido favorável, a fermentação láctica tem sido referenciada como uma estratégia de redução do teor de glicoalcaloides através da respetiva metabolização, sobretudo, por parte de algumas estirpes de BAL em particular<sup>39,40,138</sup>.

Desconhecendo em concreto o teor de alcaloides presente nestes frutos, foi testada a tolerância das estirpes de BAL selecionadas perante a adição de concentração conhecida de solanina (200 ppm). Nestas condições, a avaliação do comportamento das estirpes de BAL a testar pode ser associada, por hipótese, à capacidade de degradação deste composto, caso se verifiquem níveis de tolerância muitos distintos.

### Metodologia

O desenvolvimento das estirpes selecionadas (C244, C1090, BAL40, BAL49, BAL89, BAL82, BAL67, BAL94 e BAL97) foi analisado em meio MRS com e sem adição de 200 ppm de solanina. Foram preparadas amostras (triplicado) em 9 mL do respetivo meio, nos quais se inoculou 1 mL da respetiva estirpe (concentração inicial de 8 log UFC/mL), o que resultou em 2 tipos de amostras por estirpe: uma com adição de solanina e outra sem adição de solanina. As amostras foram posteriormente incubadas a 30 °C durante 72 horas, tendo sido retiradas alíquotas nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h, para contagem de BAL (log UFC/mL; cf. 7.2.1)

### Apresentação e Discussão de Resultados

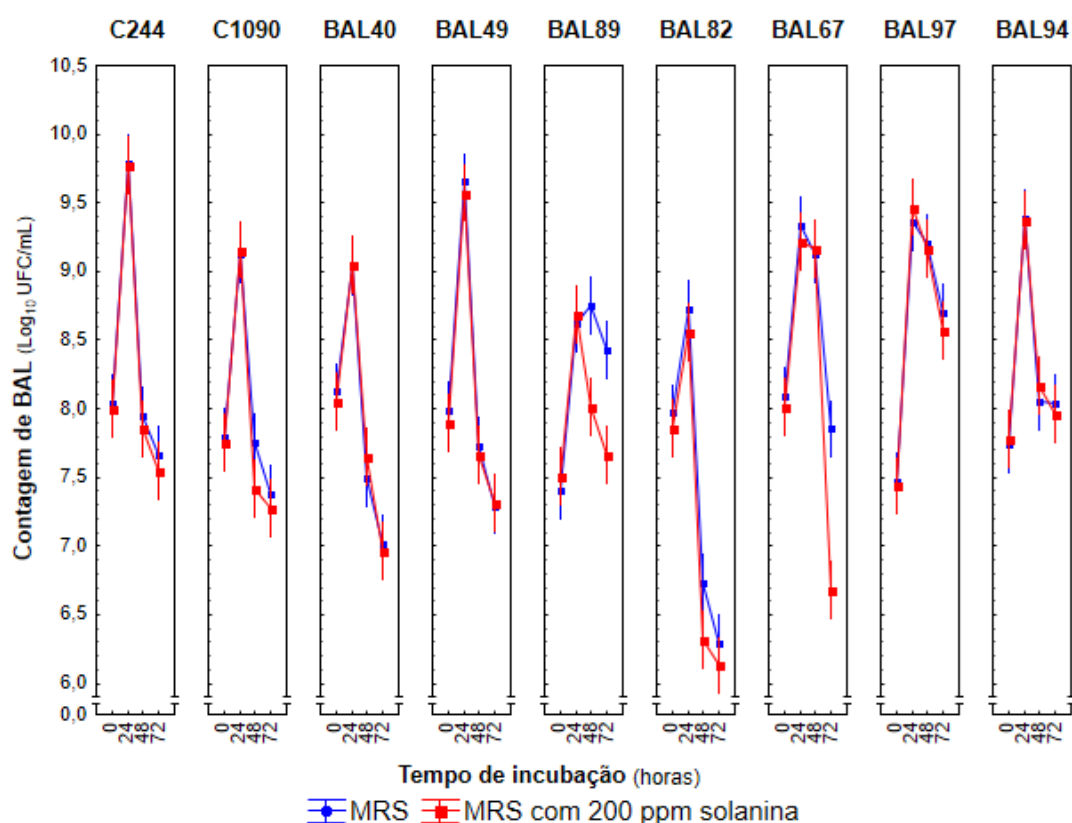
As contagens de BAL ao tempo 0 e ao fim dos respetivos tempos de incubação testados (Figura 10.4) permitiram verificar que a adição de 200 ppm de solanina ao meio MRS não influenciou o desenvolvimento das estirpes.

Durante o período testado, não foram encontradas diferenças significativas entre as contagens de BAL em meio MRS com e sem adição de solanina, exceto para a estirpe BAL89. Todas as estirpes registaram um aumento médio ( $p < 0,05$ ) nas respetivas contagens (ca. 1,4 ciclos log) após 24 h de incubação, seguido de um decréscimo gradual ( $p > 0,05$ ) durante os períodos subsequentes. Este comportamento pode indicar que o desenvolvimento bacteriano apenas foi limitado pelo esgotamento de nutrientes constituintes do meio MRS. A estirpe BAL89 apresentou contagens inferiores em meio MRS com solanina após 48 e 72 h de incubação, face ao meio MRS sem suplementação de solanina. Contudo, a sensibilidade desta estirpe à solanina é inconclusiva face às diferenças encontradas (inferiores a 1 ciclo log). Apesar dos indícios para uma maior sensibilidade à solanina por parte da BAL89, pode-se concluir que, de modo geral, o

## Caracterização da matéria-prima e de estirpes de BAL

desenvolvimento das BAL não foi influenciado pela adição de solanina (200 ppm). Com base nestes resultados, pode-se prever que a capacidade de fermentação das BAL selecionadas (a serem utilizadas como CS) não ficará comprometida face a eventuais concentrações elevadas em glicoalcaloides presentes na matriz TV (até 500 ppm).

A capacidade de degradação dos glicoalcaloides através da fermentação láctica pode alcançar *ca.* 50% do teor inicial<sup>40</sup>, dependendo das estirpes utilizadas como CS<sup>40,138</sup>. Será, portanto, de todo o interesse testar as BAL selecionadas em ensaios tecnológicos de fermentação, com determinação do conteúdo em glicoalcaloides, como estratégia para obtenção de produtos seguros.



**Figura 10.4** | Contagens de BAL (log UFC/mL) em meio MRS com e sem adição de 200 ppm de solanina, durante 72 h de incubação. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

### Considerações intercalares

- A presença de 200 ppm de solanina não influenciou o desenvolvimento das BAL.
- Serão necessários estudos mais aprofundados para confirmar se existe apenas tolerância das estirpes à presença de solanina ou se ocorre a metabolização deste glicoalcaloide durante o processo fermentativo. A semelhança entre os padrões de desenvolvimento das estirpes de BAL na presença e ausência de solanina indicia a possível capacidade de metabolizar este glicoalcaloide durante o seu desenvolvimento. No entanto, esta questão só poderá ser cabalmente confirmada pela detecção dos respectivos teores (por HPLC) antes e após a fermentação láctica de TV.

# 11. Ensaio de fermentação em tomate-indústria não amadurecido

---

Nesta secção, agrupam-se os ensaios de avaliação da fermentação espontânea e fermentação controlada de TV. Na comparação da *performance* fermentativa de estirpes como potenciais CS, foram testadas estirpes de BAL previamente selecionadas da coleção do INIAV e de estirpes que revelaram potencial probiótico *in vitro* (uma da coleção do INIAV e outra isolada do TV). Foi ainda avaliado o efeito da adição de 2,5% NaCl.

## 11.1. Fermentação espontânea

### Objetivos

Avaliar a fermentação espontânea de TV em frutos tratados e não tratados termicamente.

### Metodologia

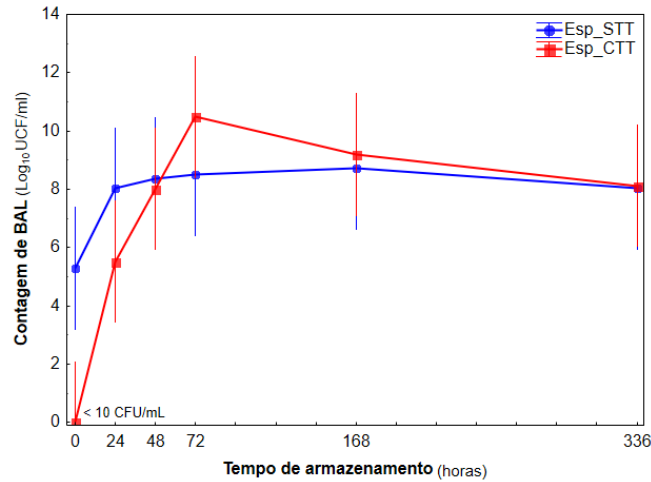
Frutos de TV das categorias verde e intermédia (na proporção 1:1) foram descongelados faseadamente. O lote inicial ( $\approx 4$  kg) foi dividido em dois, tendo metade dos frutos sido diretamente homogeneizada e a outra metade submetida a TT (100 °C / 1 min) (cf. 6.2) antes do processo de homogeneização com vista à descontaminação parcial da microbiota. A partir das respetivas polpas, foram constituídos dois tipos de amostras, em triplicado, identificados como Esp\_STT e Esp\_CTT (sem e com TT, respetivamente). As amostras (500 mL cada, em frascos de 1 L) foram incubadas sob agitação orbital fraca (100 rpm) à temperatura de 28 °C, durante 14 dias. Foram retiradas alíquotas no dia 0 e ao final dos períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 7 e 14 dias para avaliação de parâmetros microbiológicos (contagens de BAL e de B&L; cf. 7.2.1 e 7.2.2, respetivamente) e físico-químicos (pH, AT, TSS, CFT e AOx).

### Contagens de BAL e B&L

As contagens médias de BAL relativas às amostras Esp\_STT e Esp\_CTT (Figura 11.1), ilustram o desenvolvimento significativo das BAL durante o período inicial de 72 h (correspondente ao período de fermentação), em que se alcançaram contagens de ca. 8 e 10 log UFC/mL, respetivamente, ao qual se seguiu a respetiva manutenção, sem variações significativas, até ao final do período testado.

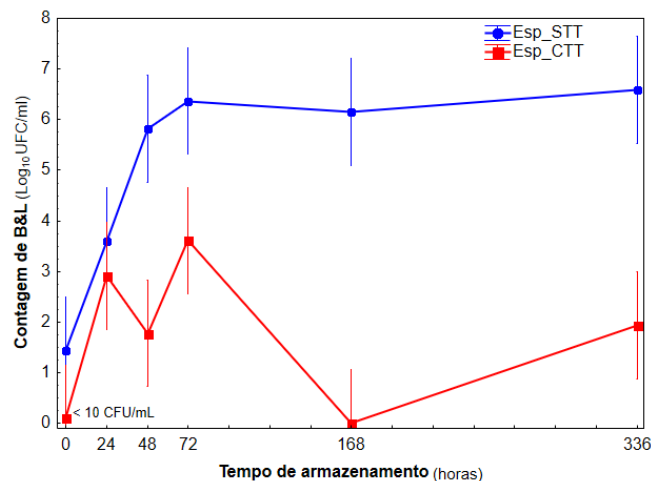
A comparação das contagens iniciais no tempo 0 entre amostras (5,3 log UFC/mL para Esp\_STT vs.  $< 10$  UFC/mL para Esp\_CTT) revelou uma diminuição significativa sob o efeito do TT. No entanto, este efeito não comprometeu o posterior desenvolvimento de BAL, uma vez que, logo ao fim de 24 h de fermentação, as amostras Esp\_CTT obtiveram contagens semelhantes às das Esp\_STT, sem variações adicionais entre ambas até ao final do ensaio. As contagens iniciais observadas nas amostras Esp\_CTT ( $< 1$  ciclo log) e o subsequente nível de desenvolvimento alcançado nos produtos fermentados (8–10 log UFC/mL) confirmaram a elevada aptidão da microbiota autóctone (BAL e/ou leveduras) para a fermentação de TV. Este facto reforça o interesse no isolamento e caracterização da microbiota endógena com o objetivo de se desenvolverem CS adaptadas a esta matriz.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.1** | Variação nas contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV com (Esp\_CTT) e sem (Esp\_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

A variação das contagens médias do grupo de B&L nas amostras fermentadas de polpa de TV com e sem TT encontra-se ilustrada na Figura 11.2.



**Figura 11.2** | Variação nas contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV com (Esp\_CTT) e sem (Esp\_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

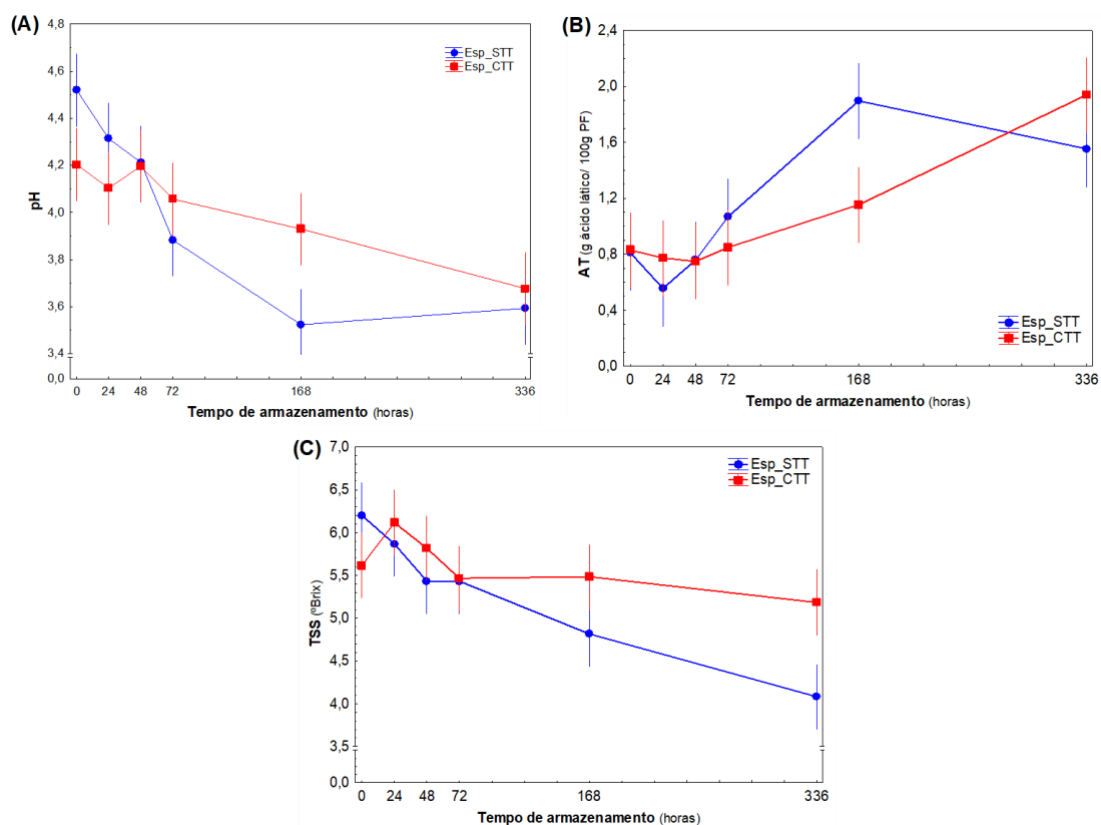
A comparação das contagens médias iniciais (no tempo 0) entre ambas as amostras, permitiu constatar o efeito da descontaminação associada ao TT aplicado, assinalando uma redução de ca. 1,5 log UFC/mL, com as amostras Esp\_CTT a contabilizar contagens iniciais < 10 UFC/mL. Ao fim de 24 h, ambas as amostras apresentaram contagens semelhantes (ca. 3,2 log UFC/mL). A partir deste intervalo, e até ao final do período testado, as amostras Esp\_CTT denotaram sempre contagens significativamente inferiores ( $\leq 3,6$  log UFC/mL) face às amostras Esp\_STT, com contagens, no mesmo período, de ca. 6,4 log UFC/mL. Para este grupo microbiano, o nível de redução inicial alcançado refletiu-se num desenvolvimento significativamente inferior deste grupo nas amostras tratadas termicamente.

## Ensaio de Fermentação

Na descontaminação parcial de diferentes matrizes vegetais para fermentação: sumo de tomate (92 °C / 5 s.)<sup>139</sup>, néctar de batata-doce roxa (110 °C / 8,6 s.)<sup>140</sup>, sumo de romã (65–95 °C / 30–60 s.)<sup>141</sup>, sumo de coco (96 °C / 6 min.)<sup>142</sup>, sumo de laranja, papaia, melão e cenoura (80 °C / 3 min.)<sup>143</sup>, sumo de cereja (70 °C / 30 s.)<sup>144</sup> e néctar de manga (110 °C / 8,6 s.)<sup>145</sup>, a redução da microbiota inicial, alcançada após TT, assinalou níveis de descontaminação iguais ou superiores a 3 ciclos Log. Nos estudos mencionados, os níveis de descontaminação foram superiores aos alcançados nas presentes condições do ensaio possivelmente devido ao facto de serem sumos (e, em consequência, líquidos face às polpas de maior consistência), o que facilita os fenómenos de transferência de calor e confere um efeito de descontaminação superior.

### Variação do pH, da AT e do TSS

As variações de pH e AT, ilustradas nas Figura 11.3A-B (e Tabela VI.5, Anexo H –), revelaram tendências semelhantes (diminuição e aumento do pH e da AT, respetivamente) entre amostras ao longo de todo o período testado.



**Figura 11.3 |** Variação de (A) pH, (B) AT (g AL/100 g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de tomate com (Esp\_CTT) e sem (Esp\_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras Esp\_STT, o decréscimo de pH (ca. 0,9 unidades) durante o armazenamento foi superior e mais rápido do que nas amostras Esp\_CTT, cujo decréscimo de pH foi de ca. 0,5 unidades. Da mesma forma, o aumento da AT nos fermentados durante o armazenamento ocorreu mais rapidamente nas amostras Esp\_STT em comparação com as Esp\_CTT, com variações de 0,7 e 1,1 g AL/100 g PF, respetivamente. A variação dos valores de TSS das

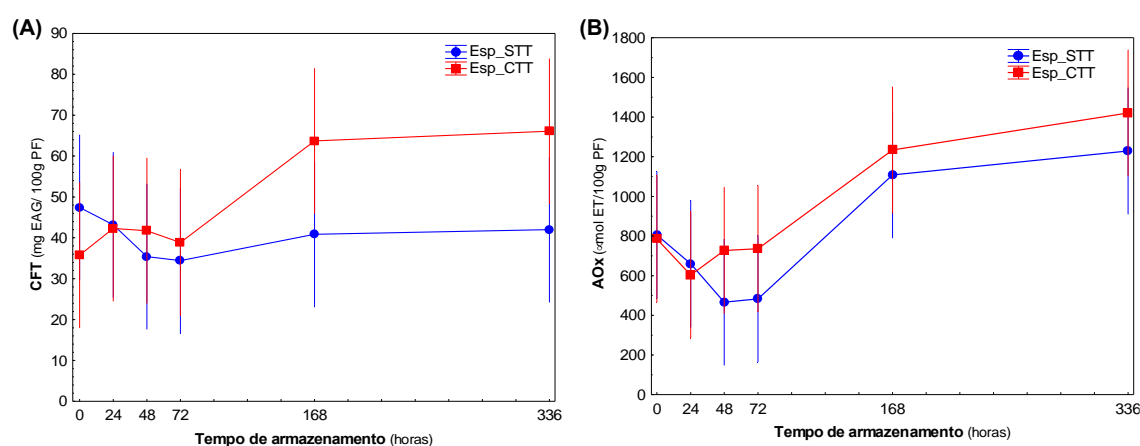
## Ensaio de Fermentação

amostras Esp\_STT, ilustrada na Figura 11.3C (e Tabela VI.5, Anexo H –), revelou uma tendência de diminuição (ca. 1,4 °Brix), que apenas mostrou significância estatística ao fim de 168 h. Para as amostras Esp\_CTT, as variações de TSS não foram significativas ao longo de todo o período testado, não tendo excedido 0,4 °Brix.

Em ensaios com diferentes matrizes vegetais: sumo de tomate (92 °C / 5 s.)<sup>139</sup>, néctar de batata-doce roxa (110 °C / 8,6 s.)<sup>140</sup>, sumo de coco (96 °C / 6 min.)<sup>142</sup>, sumo de laranja, papaia, melão e cenoura (80 °C / 3 min.)<sup>143</sup>, sumo de cereja (70 °C / 30 s.)<sup>144</sup>, néctar de manga (110 °C / 8,6 s.)<sup>145</sup>, sumo de beterraba e cenoura (80 °C / 15 min.)<sup>146</sup> e sumo de romã (110 °C / 8,6 s.)<sup>147</sup>, os parâmetros pH, AT e TSS dos produtos também não foram influenciados significativamente pelo TT aplicado.

### Variação do CFT e AOx

Nas Figura 11.4A-B (e Tabela VI.5, Anexo H –) são apresentadas as variações do CFT e da AOx das amostras Esp\_STT e Esp\_CTT. Para ambos os parâmetros, as amostras não revelaram variações significativas entre si e ao longo de 14 dias, verificando-se, assim, a manutenção dos valores iniciais. No entanto, as amostras Esp\_CTT verificaram valores tendencialmente superiores face às amostras Esp\_STT.



**Figura 11.4 |** Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOx (μmol ET/100g PF) de amostras de polpa de TV com (Esp\_CTT) e sem (Esp\_STT) aplicação de TT, durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Resultados semelhantes foram observados em estudos de fermentação de néctar de batata-doce roxa (110 °C / 8,6 s.)<sup>140</sup>, sumo de romã (65–95 °C / 30–60 s.)<sup>141</sup>, sumo de cereja (70 °C / 30 s.)<sup>144</sup>, sumo de cenoura, beterraba e maçã (80 °C / 15 min.)<sup>146</sup> e sumo de tomate (90 °C / 30–60 s.)<sup>148</sup>, os quais reportaram que o TT prévio à fermentação não afetou o CFT nem a AOx dos fermentados ao longo do período ensaiado.

### Considerações intercalares

- O TT dos frutos inteiros (100 °C / 1 min.) conduziu a uma diminuição significativa da microbiota inicial presente na matéria-prima (relativamente aos dois grupos microbiológicos testados: BAL e B&L), com as amostras tratadas a revelarem contagens inferiores a 1 ciclo log.

## Ensaio de Fermentação

- O TT aplicado não afetou o desenvolvimento das BAL, mas exerceu influência sobre os parâmetros físico-químicos (pH, AT e TSS). Assim, verificou-se que o TT acentuou o atraso no processo de fermentação uma vez que as variações significativas de pH, TSS e AT das amostras Esp\_CTT ocorreram tardiamente face às das amostras Esp\_STT.
- Os teores de CFT e de AOx dos fermentados não foram afetados pelo TT aplicado.

## Ensaio de Fermentação

## 11.2. Fermentação controlada (5 estirpes de BAL alóctones)

### Objetivo

Testar a *performance* fermentativa de 5 estirpes alóctones de BAL, previamente selecionadas da coleção do INIAV, como CS na fermentação de TV face ao processo fermentativo espontâneo.

### Metodologia

A partir de frutos de TV armazenados (-20 °C), procedeu-se à respetiva descongelação faseada e constituiu-se um lote de ≈ 5,5 kg, respeitando a proporção 1:1 relativamente às categorias verde e intermédio. Parte desta mistura foi submetida, em inteiro, a TT (100 °C / 1 min.), ao qual se seguiu a respetiva homogeneização (polpas parcialmente descontaminadas; cf. 6.2). Os restantes frutos foram diretamente homogeneizados, sem TT prévio (polpas com a microbiota inalterada).

Com as polpas parcialmente descontaminadas (200 mL cada, em frascos de 500 mL), foram preparados 5 tipos de amostras, em triplicado, através da inoculação de ≈ 13,3 mL (cf. 7.1) de cada uma das 5 estirpes BAL selecionadas (

Tabela 11.1), e cuja identificação reflete a estirpe utilizada (Id: C244, C202, C170, C1170 e C1090). Foi também considerada a preparação, nas mesmas condições (200 mL cada, em frascos de 500 mL), de dois tipos de amostras controlo (não inoculadas com estirpes de BAL) a partir de polpas homogeneizadas com e sem TT (Id: Esp\_CTT e Esp\_STT, respetivamente).

No curso do processo, todas as amostras foram incubadas sob agitação orbital fraca (100 rpm) à temperatura de 28 °C, durante 14 dias. Foram retiradas alíquotas de cada amostra no dia 0 e ao final dos períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 7 e 14 dias para avaliação de parâmetros microbiológicos (contagens de BAL e B&L; cf. 7.2.1 e 7.2.2, respetivamente) e físico-químicos (pH, AT, TSS e parâmetros CIELab). No dia 0 e ao final de 7 e 14 dias, foi também realizada uma avaliação do CFT das amostras. No último dia de armazenamento, foi efetuada uma análise sensorial das amostras fermentadas considerando os atributos da cor e aroma.

**Tabela 11.1** | Identificação das 5 estirpes de BAL alóctones utilizadas no ensaio e dados literários que suportam a respetiva seleção.

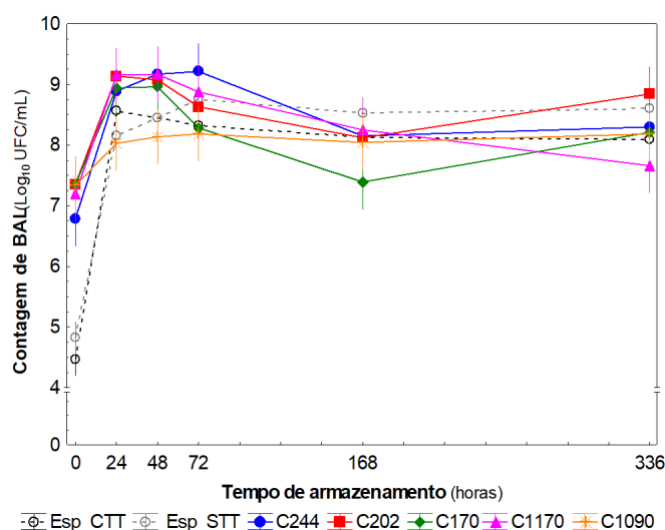
Amostra	Estirpe	Justificação	Matriz vegetal	Referências
C244, C202, C1170	<i>L. plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frequentemente utilizada como CS na fermentação de diversos HF;</li> <li>• Apresenta potencial probiótico.</li> </ul>	Tomate	Di Cagno et al. (2009) <sup>44</sup> ; El-Sayed et al. (2018) <sup>151</sup> ; Liu et al. (2018) <sup>52</sup> ; Vitali et al. (2012) <sup>149</sup>
			Alface	Ray & Joshi (2014) <sup>152</sup> ; Septembre-Malaterre et al. (2017) <sup>153</sup>
			Azeitonas verdes	Blana et al. (2014) <sup>154</sup> ; Ray & Joshi (2014) <sup>152</sup>
			Pepino	Di Cagno et al. (2013) <sup>8</sup> ; Ray & Joshi (2014) <sup>152</sup>
			Beterraba	Jafar et al. (2019) <sup>155</sup>
			Melância	Amanda & Choo (2018) <sup>156</sup>
			Pimento	Alberto et al. (2013) <sup>157</sup>
C170	<i>L. pentosus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta potencial probiótico.</li> </ul>	Azeitonas verdes	Blana et al. (2014) <sup>154</sup>
			Beterraba	Silvério (2014) <sup>146</sup>
			Alcaparras	Di Cagno et al. (2013) <sup>8</sup>

## Ensaio de Fermentação

Amostra	Estirpe	Justificação	Matriz vegetal	Referências
C1090	<i>W. paramesenteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Frequentemente utilizada como CS na fermentação de diversos HF;</li> <li>Apresenta potencial probiótico.</li> </ul>	Azeitonas verdes	Ray & Joshi (2014) <sup>152</sup>
			Sauerkraut	A. & A. (2019); Di Cagno et al. (2013) <sup>8</sup>
			Pimento	Alberto et al. (2013) <sup>157</sup>
			Beterraba	Silvério (2014) <sup>146</sup>
			Alface	Ray & Joshi (2014) <sup>152</sup> ; Septembre-Malaterre et al. (2017) <sup>153</sup>
Cenoura	Silvério (2014) <sup>146</sup> ; Vitali et al. (2012) <sup>149</sup>			

### Contagens de BAL e B&L

A variação das contagens médias de BAL presentes nas polpas de TV durante o período de armazenamento é apresentada na Figura 11.5.



**Figura 11.5** | Variação das contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

A evolução da população de BAL de todas as amostras ao longo do período testado revelou um comportamento semelhante, caracterizado pelo aumento significativo das respetivas contagens durante as primeiras 24 h, atingindo níveis na ordem de 8,0 a 9,2 log UFC/mL (dependente do tipo de amostra), seguido da manutenção destes níveis durante os intervalos subsequentes. Estes resultados confirmam a capacidade das estirpes testadas e da microbiota láctica para a fermentação da polpa de TV, bem como apontam para a manutenção da respetiva viabilidade ( $> 7$  log UFC/mL) após duas semanas de armazenamento à temperatura de 28 °C.

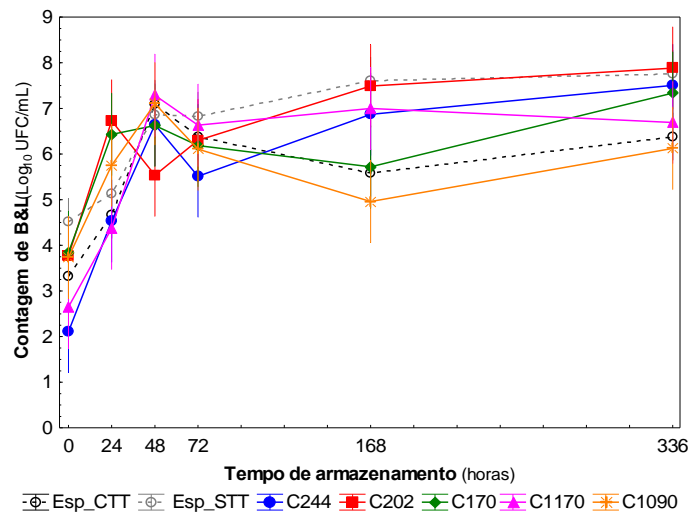
No tempo 0, as contagens de BAL nas amostras inoculadas, a variar entre 6,8 e 7,4 log UFC/mL, foram significativamente superiores às contabilizadas nas duas amostras controlo (4,5 e 4,8 log UFC/ml para Esp\_CTT e Esp\_STT, respetivamente), refletindo o efeito da adição do inóculo ( $\approx 8$  log UFC/mL). Nos dois tipos de amostras controlo (Esp\_STT e Esp\_CTT), não foram verificadas diferenças significativas entre as contagens de BAL ao tempo 0, indicativo de que o padrão de desenvolvimento da microbiota láctica não foi influenciado pelo TT, contrariamente ao verificado no ensaio anterior, onde as amostras submetidas ao TT apresentaram contagens

## Ensaio de Fermentação

significativamente inferiores face às amostras sem TT. Nas amostras inoculadas, verificou-se uma taxa de desenvolvimento das BAL semelhante (aumento de ca. 1,8 log UFC/mL nas primeiras 24 h de fermentação), com exceção da amostra C1090. Nesta, a taxa de desenvolvimento foi inferior, em ca. 2,5 vezes, indiciando, assim, uma menor aptidão para fermentar o substrato.

No final do período de armazenamento, todas as amostras inoculadas apresentaram contagens de BAL > 7,5 log UFC/mL. Estes valores podem ser considerados promissores com vista ao potencial probiótico do produto, uma vez que nos produtos fermentados exige-se níveis  $\geq 7$  log UFC/mL de bactérias probióticas no produto final.

A evolução das contagens médias para o grupo de B&L ao longo do período testado (Figura 11.6) caracterizou-se, para todas as amostras, pelo aumento significativo das contagens ao fim de 48 h (a variar de 2,1 a 4,5 log UFC/mL). A partir deste período, verificou-se a manutenção das contagens até ao final do período testado (variando de 6,1 a 7,9 log UFC/mL). A exceção a este comportamento foi a amostra C202, cujo aumento significativo foi logo observado às 24 h de fermentação. A comparação das contagens de B&L entre as amostras Esp\_STT e Esp\_CTT (ca. 1,2 ciclos log) permitiu concluir que o TT de descontaminação das polpas de TV foi ligeiramente mais eficaz para este grupo microbiano face à microbiota láctica. De facto, todas as amostras inoculadas (C244, C202, C170, C1170 e C1090) apresentaram contagens de B&L inferiores comparativamente à amostra Esp\_STT (ca. 1,3 ciclos log). Esta amostra apresentou uma contagem inicial mais elevada, possivelmente, por não ter sido submetida ao TT. No entanto, a redução das contagens microbianas de B&L não impediu o desenvolvimento deste grupo, com provável influência na evolução dos parâmetros físico-químicos ao longo do período testado.

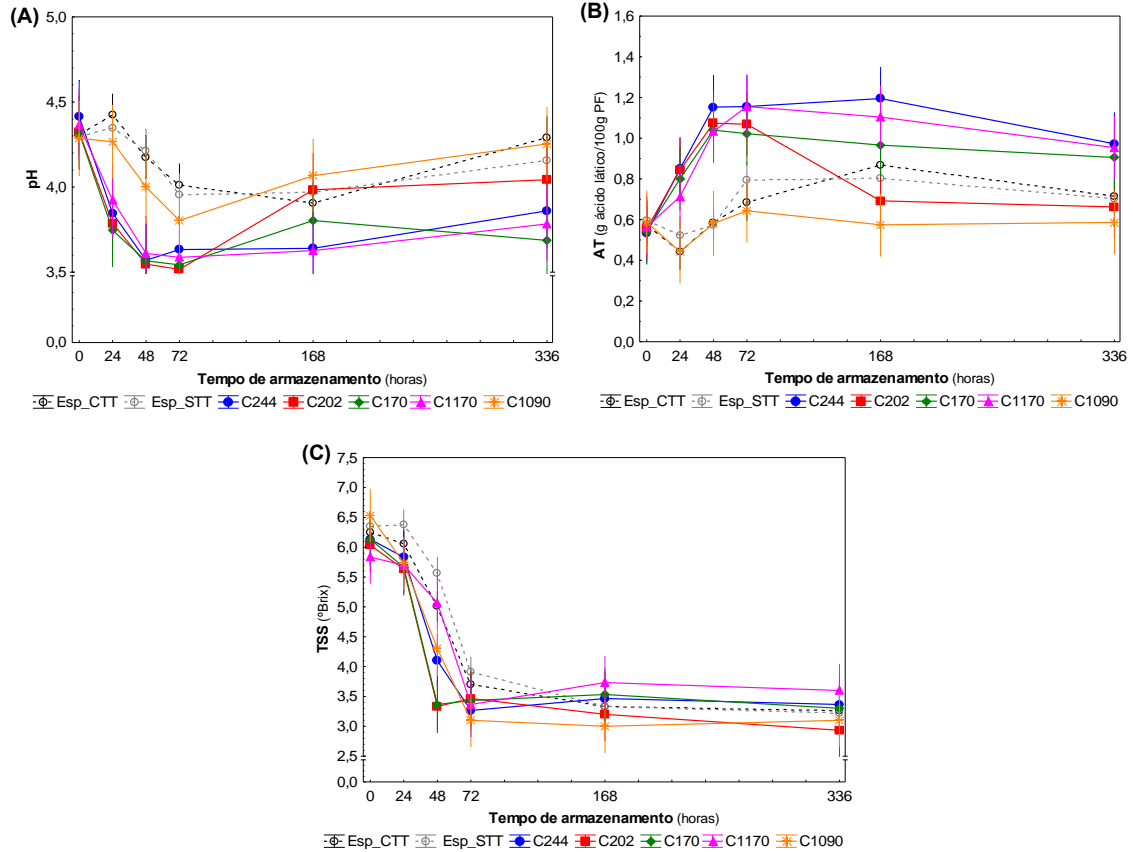


**Figura 11.6** | Variação das contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

# Ensaio de Fermentação

## Variação do pH, AT e TSS

O decréscimo do pH e o conseqüente aumento da AT durante a fermentação láctica das amostras de TV (inoculadas e controlos) encontram-se ilustrados nas Figura 11.7A-B (e Tabela VI.6, Anexo I –).



**Figura 11.7** | Variação de (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras inoculadas (C244, C202, C170 e C1170), verificou-se, ao fim de 48 h, uma diminuição significativa nos valores iniciais de pH ( $\approx 4,3$ ) de ca. 0,7 unidades, sem diferenças significativas entre si. Após 72 h de fermentação, observou-se, nas mesmas, uma ligeira tendência de aumento do pH ( $p > 0,05$ ), alcançando valores finais de ca. 3,8 unidades. Na amostra C1090, a diminuição de pH relativa ao período de 48 h foi menor (ca. 0,5 unidades) face às restantes amostras inoculadas. Por outro lado, as variações de pH nesta amostra nunca foram significativas no total do armazenamento. Nas amostras controlo (Esp\_CTT e Esp\_STT), o decréscimo significativo dos valores de pH (ca. 0,4 unidades) foi apenas observado ao fim de 168 h, período após o qual os valores tenderam a aumentar ( $p > 0,05$ ), alcançando valores finais de ca. 4,2 (sem diferenças significativas face aos valores iniciais). Nestas amostras, a taxa de diminuição de pH foi inferior à verificada nas amostras inoculadas (com exceção da C1090).

O aumento da AT (correlacionado inversamente com a diminuição do pH) das amostras inoculadas (com exceção da C1090), ilustrado na Figura 11.7B, assinala igualmente a tendência

## Ensaio de Fermentação

de acidificação dos fermentados ao longo do período testado. Assim, para as amostras C244, C202, C170 e C1170, verificou-se um aumento significativo nos valores iniciais de AT (de ca. 0,5 g AL/100 g PF) ao fim de 48 h, sem diferenças ( $p < 0,05$ ) entre si. No período subsequente, não foram registadas variações significativas adicionais. Para a amostra C1090, os valores de AT mantiveram-se semelhantes face aos valores iniciais (ca. 0,6 g AL/100 g PF), denotando-se a ausência de variações durante o total do período testado. Nas amostras controlo (Esp\_CTT e Esp\_STT), o aumento da AT decorreu mais lentamente, uma vez que a variação significativa apenas foi alcançada ao fim de 168 h de armazenamento, para valores médios de ca. 0,8 g AL/100 g PF. Em suma, o processo de acidificação dos produtos fermentados, constatado pelas variações de pH e AT ao longo do período testado nas amostras inoculadas (com exceção da amostra C1090) e nas amostras controlo (fermentação espontânea) ocorreu ao fim de 48 h e de 7 dias, respetivamente.

Estudos em polpa de tomate<sup>159</sup> e pó de tomate<sup>160</sup> fermentados por *L. sakei* e *P. pentosaceus* verificaram diminuições de pH e aumentos de AT semelhantes aos descritos no presente estudo, com variações significativas ao fim de 48 h de fermentação. Num estudo relativo à fermentação de *smoothies* constituídos por diversos HF, foram igualmente reportados decréscimos significativos de pH (ca. 19 %) e aumentos significativos da AT (ca. 46 %) em amostras inoculadas com um conjunto diversificado de estirpes de BAL<sup>161</sup>. No âmbito da fermentação láctica de diferentes produtos vegetais: pimentão<sup>157</sup>, *smoothies*<sup>161</sup> e diversos HF crus<sup>41</sup>, foi igualmente constatado o atraso no processo de acidificação no caso da fermentação espontânea em comparação com os processos de fermentação controlada. Di Cagno et al. (2016) referem ainda, a favor da fermentação controlada, que o atraso observado na acidificação da fermentação espontânea introduz a oportunidade para o desenvolvimento de microrganismos de deterioração (ou mesmo patogénicos), podendo, conseqüentemente, comprometer a segurança do produto e aumentar o risco de ocorrerem variações sensoriais indesejáveis no produto final.

A variação do TSS ao longo do período testado, apresentada na Figura 11.7C (e Tabela VI.6, Anexo I –), representa, indiretamente, o consumo de açúcares pela microbiota em desenvolvimento. Durante as primeiras 72 h de fermentação, os valores de TSS diminuíram significativamente, ca. 3 °Brix, em todas as amostras inoculadas. Faz-se notar que, nas amostras C170 e C202, a taxa de decréscimo significativo, de ca. 2,7 °Brix, ocorreu logo ao fim de 48 h de fermentação. No período posterior às 72 h, os valores de TSS mantiveram-se estáveis, sem variações significativas. Para estas amostras, a diminuição significativa de TSS correlacionou-se com o desenvolvimento expressivo da população de BAL, resultado igualmente reportado por El-Sayed et al. (2018). No caso das amostras controlo, verificou-se um comportamento semelhante, com uma taxa de decréscimo significativo ao fim de 72 h, de ca. 2,5 °Brix.

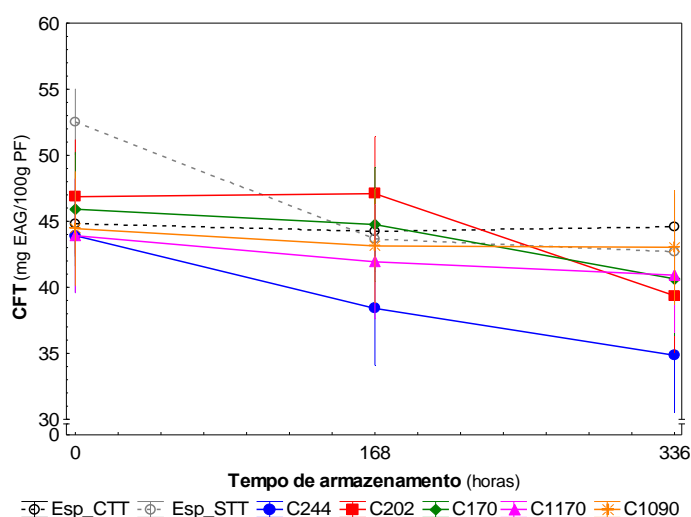
Através da evolução dos parâmetros físico-químicos (pH, AT e TSS) e das contagens de BAL nas amostras inoculadas, foi possível distinguir dois comportamentos quanto à aptidão fermentativa: as amostras inoculadas com as estirpes C244, C202, C170 e C1170, pertencentes ao género *Lactiplantibacillus*, que exibiram um processo de acidificação mais acentuado (para

## Ensaio de Fermentação

$\Delta t = 48$  h, decréscimo médio de pH de 18 % e acréscimo médio de AT de 95 %) e um aumento médio de contagens de BAL de ca. 2 ciclos Log ( $\Delta t = 24$  h); e a amostra C1090, pertencente à espécie *W. paramesenteroides*, cuja acidificação contabilizou, no período inicial de 48 h, um decréscimo de pH de 11 % e um aumento de AT de 8 %, com um menor desenvolvimento de BAL de 0,7 ciclos Log para  $\Delta t = 24$  h.

### Variação do CFT

O CFT avaliado nas amostras inoculadas e controlos ao longo dos 14 dias, ilustrado na Figura 11.8 (Tabela VI.7, Anexo I –), não denotou diferenças significativas entre si, com exceção das amostras Esp\_STT no dia 0, cujos valores médios (52,5 mg EAG/100 g PF) foram significativamente superiores aos das restantes amostras. O facto destas amostras não terem sido tratadas termicamente poderá justificar, em parte, estes valores (superiores em ca. 15%). Embora não tenham sido detetados efeitos significativos na variação da quantificação fenólica das amostras na dependência da estirpe e do tempo de armazenamento, faz-se notar que, para as amostras C244, verificou-se uma tendência de diminuição ( $p > 0,05$ ) ao longo do período testado.



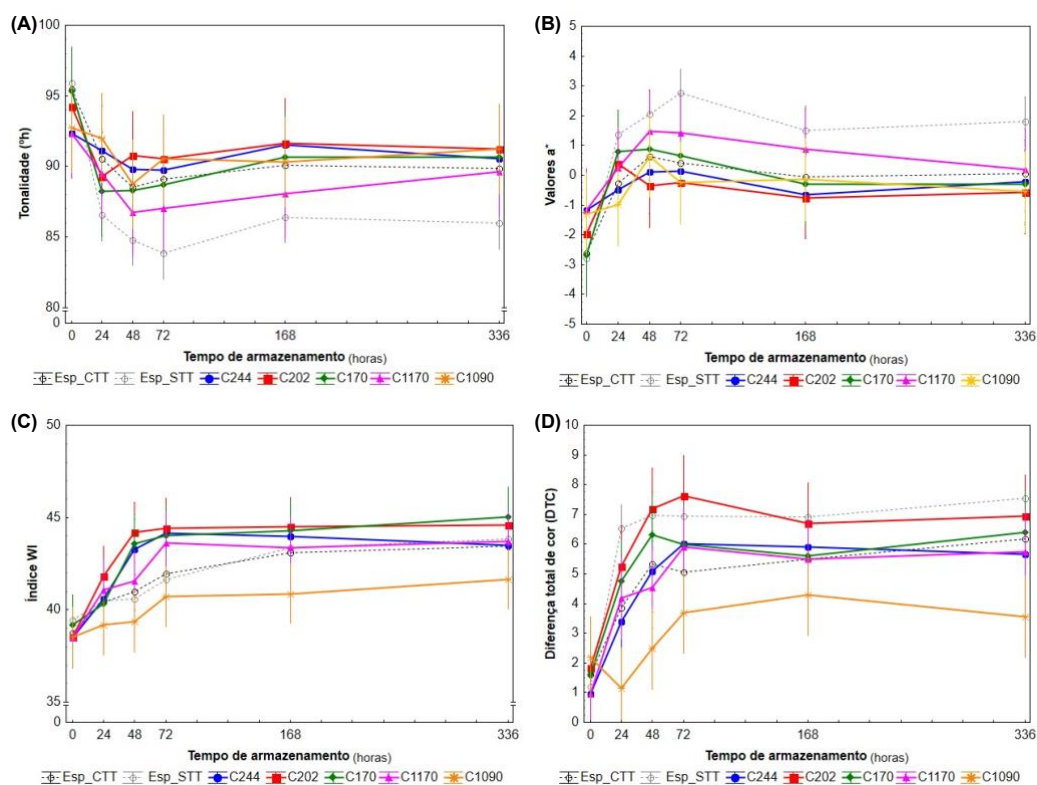
**Figura 11.8** | Variação do CFT (mg EAG/100g PF) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Na literatura, os dados relativos à variação da composição fenólica durante a fermentação conduzida por diferentes estirpes em diversos produtos vegetais refletem tendências muito diversificadas<sup>162</sup>, com múltiplas referências a casos de aumento, diminuição ou manutenção dos teores iniciais durante os períodos de fermentação e armazenamento, na dependência das estirpes utilizadas.

### Variação dos parâmetros CIELab

As variações dos parâmetros CIELab ( $^{\circ}h$ ,  $a^*$ , WI e DTC) das amostras fermentadas de polpa de TV encontram-se ilustradas nas Figura 11.9A-D, respetivamente.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.9** | Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro  $a^*$ , (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170, C1090) e para as amostras não inoculadas (Esp\_CTT, Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

A tendência geral de alteração da tonalidade das amostras, expressa pelas variações de  $^{\circ}h$  (Figura 11.9A), caracterizou-se por um decréscimo durante o período inicial de 48 h, seguido da respetiva manutenção no período subsequente, sem diferenças entre tipos de amostras. As variações de  $a^*$  (Figura 11.9B) traduzem as variações entre a tonalidade verde (valores negativos) e a tonalidade vermelha (valores positivos). No caso, todas as amostras denotaram valores negativos e apresentaram uma evolução semelhante, caracterizada pelo aumento durante os períodos iniciais da fermentação (0 – 48 h) e respetiva manutenção até ao final do período de armazenamento, sem variações adicionais. O comportamento destes dois parâmetros (significativamente correlacionados,  $r = -0,99$ ) traduziu uma ligeira perda da tonalidade verde inicial dos fermentados, com particular destaque para a amostra Esp\_STT, onde as variações de  $^{\circ}h$  e  $a^*$  (e conseqüente perda da tonalidade verde) foram mais acentuadas e visualmente perceptíveis. Esta amostra não foi tratada termicamente, pelo que a fermentação poderá ter envolvido uma microbiota mais diversificada (quer de BAL como de B&L), podendo, assim, justificar o desenvolvimento de um padrão de fermentação distinto com reflexo na evolução destes parâmetros.

O índice WI expressa a variação entre cores mais claras e mais escuras. O aumento de WI traduz o aclaramento e, inversamente, a diminuição de WI o escurecimento das amostras. A evolução deste parâmetro foi semelhante para todas as amostras (Figura 11.9C): aclaramento significativo durante as primeiras 48 h e, após este período, manutenção dos respetivos valores

## Ensaio de Fermentação

de WI até ao final do ensaio. Entre as amostras inoculadas, a amostra C1090 mostrou-se como exceção ao denotar valores de WI inferiores (sem variações significativas durante todo o período testado) e, em consequência, exibir maiores níveis de escurecimento. A evolução de WI acompanhou as variações na acidificação dos respetivos fermentados (correlações significativas com pH ( $r = -0,42$ ) e AT ( $r = 0,45$ )), o que aponta a oxidação enzimática como possível origem para o escurecimento dos fermentados. De facto, as polifenol oxidases (PPO; EC 1.10.3.1), enzimas responsáveis pelo escurecimento, são inibidas em ambiente ácido ( $\text{pH} < 4$ ).

A diferença total da cor (DTC) avalia numericamente o grau de alteração da cor face à condição inicial (quanto maior, maior é a alteração da cor), sem evidenciar o sentido dessa variação. Da Figura 11.9D, é possível verificar que, para todas as amostras (com exceção da C1090), os valores de DTC aumentaram significativamente durante o período de fermentação (24–48 h), sem variações adicionais até ao final do ensaio. Assim, a DTC das amostras apresentou variações entre 3 e 5 unidades (em função do tipo de amostra), sendo classificadas como muito distintas<sup>87</sup> (cf. Tabela 8.1). A amostra C1090 foi a exceção a este comportamento, ao exibir apenas uma pequena variação de cor ( $\Delta\text{DTC} \approx 1$  unidade), segundo a mesma classificação<sup>87</sup>.

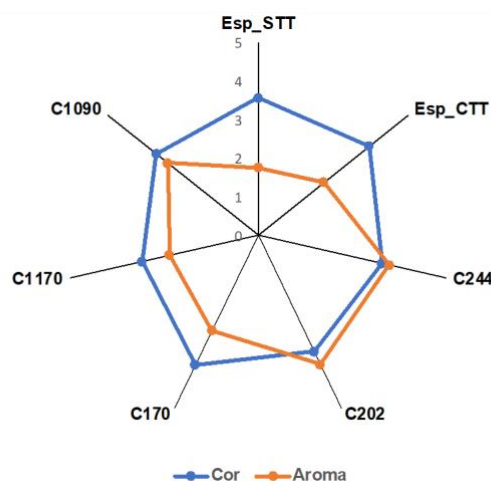
A correlação entre os valores de  $a^*$ ,  $^{\circ}\text{h}$ , WI e DTC (Tabela VI.8, Anexo I –) ajuda a esclarecer o sentido de variação de cor manifestado pelas amostras. O parâmetro DTC correlacionou-se significativamente com os restantes parâmetros colorimétricos avaliados:  $a^*$  ( $r = 0,63$ ),  $^{\circ}\text{h}$  ( $r = -0,63$ ) e WI ( $r = 0,65$ ), salientando o escurecimento e a perda de tonalidade verde como as principais alterações da cor das amostras durante o período testado.

No estudo sobre a fermentação de sumo de tomate (com inoculação de estirpes *B. breve* e *B. longum*), as variações dos parâmetros de cor foram classificadas como significativas<sup>163</sup>. Contrariamente, no estudo de Di Cagno et al. (2011) sobre a fermentação láctica de *smoothies* de vários HF em mistura, não foram observadas variações significativas nos atributos da cor durante o armazenamento. Em fermentados de cenoura, foi observada uma ligeira alteração da cor durante o armazenamento, enquanto que, em fermentados de rabanete branco e de couve roxa, estas variações foram mais pronunciadas<sup>164</sup>. Na fermentação láctica de sumo de amora, as alterações ligeiras observadas na cor dos fermentados mostraram ser dependentes da estirpe de BAL inoculada<sup>165</sup>. A associação da alteração da cor de fermentados ao metabolismo bacteriano durante o processo de fermentação foi referida por El-Sayed et al. (2018) no estudo de caracterização de fermentados de sumo de tomate. Em suma, a variação da cor dos produtos fermentados durante a fermentação láctica e ao longo do armazenamento salienta a influência do tipo de matéria-prima fermentada e da estirpe inoculada.

### Análise sensorial

Os fermentados de TV foram avaliados sensorialmente por um painel de provadores (Figura 11.10) apenas no último dia de armazenamento, com avaliação dos atributos da cor e aroma segundo uma escala hedónica de 1 a 5 (cf. 8.10).

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.10** | Classificações médias atribuídas durante a avaliação sensorial da cor e do aroma de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170, C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT, Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente) ao 14º dia de armazenamento.

A cor das polpas fermentadas inoculadas e não inoculadas obteve classificações positivas, com valores médios  $\geq 3$  e sem diferenças significativas entre si. Isto sugere que a cor das amostras fermentadas não manifestou alterações com sentido depreciativo e, portanto, este atributo não constituiu um fator crítico para a aceitação sensorial deste produto. Tal conclusão vai de encontro aos resultados obtidos durante a avaliação instrumental da cor, nos quais não foram observadas diferenças muito expressivas entre amostras ( $p > 0,05$ ).

Quanto ao aroma, as classificações entre amostras foram mais discriminatórias. As amostras C244, C202 e C1090 obtiveram uma classificação média  $\geq 3$ . Nestas, foram descritos pelos provadores (em nota na ficha de prova) vários tipos de aromas, todos eles considerados agradáveis: frutados de maçã, azeitona e uva. Em contrapartida, as amostras controlo e as amostras C170 e C1170 obtiveram classificações médias inferiores ( $< 3$ ) e cujos aromas anotados nas fichas de prova apresentaram caráter depreciativo como azedo, podre, fecal e vômito. O desenvolvimento de aromas desagradáveis obtidos nestas quatro amostras correlacionou-se inversamente com o nível de aceitação (apreciação global), conduzindo, por isso, à sua rejeição sensorial. As amostras C244 e C202 (ambas inoculadas com estirpes pertencentes à espécie *L. plantarum*) destacaram-se com níveis de aceitação sensorial mais elevados. Esta espécie bacteriana tem ampla utilização como CS em diversos processos fermentativos de HF e é reconhecida por contribuir favoravelmente para as características organolépticas, sabor e textura dos fermentados<sup>166</sup>. Os resultados deste ensaio indicam que a utilização das estirpes *L. plantarum* C244 e C202 poderão, portanto, contribuir para o aprimoramento sensorial dos fermentados de polpa de TV.

A depreciação sensorial observada no caso da fermentação espontânea (Esp\_STT e Esp\_CTT) pode ser justificada pela presença de uma população mais diversificada de microrganismos heterofermentativos na microbiota do TV, dando origem ao desenvolvimento de aromas desagradáveis. Isto salienta as dificuldades acrescidas em garantir uma qualidade sensorial aceitável e de forma reprodutível para o processo de fermentação espontânea.

## Ensaio de Fermentação

### Considerações intercalares

- Nos fermentados de TV inoculados com culturas puras de *Lactiplantibacillus* (C244, C202, C170 e C1170), o aumento significativo das contagens de BAL nas primeiras 24 h (ca. 2 log UFC/mL), bem como a variação dos parâmetros pH, AT e TSS, confirmam a aptidão das mesmas para a fermentação láctica da polpa de TV. A utilização da estirpe C1090 (*W. paramesenteroides*) foi a exceção a este comportamento.
- No final do período de armazenamento, todos os fermentados de TV inoculados apresentaram contagens de BAL superiores a 7,5 log UFC/mL, o que pode ser considerado promissor caso as mesmas possuam potencial probiótico.
- O CFT de todos os fermentados não manifestou variações significativas durante o período de armazenamento relativamente aos respetivos teores iniciais, a variar na gama 35–47 mg EAG/100 g PF.
- A cor dos fermentados manifestou variações significativas após a fermentação, nomeadamente quanto aos níveis de escurecimento e perda da tonalidade verde. No entanto, a cor final de todos os fermentados, avaliada pelo painel de provadores, obteve níveis de aceitação, independentemente do tipo de fermentação e da estirpe utilizada.
- A apreciação do aroma dos fermentados foi o atributo que mais influenciou a sua aceitação e revelou-se dependente da estirpe utilizada. Apenas os fermentados inoculados com as estirpes *L. plantarum* C244 e C202 obtiveram uma classificação sensorial positiva face a este atributo.
- A fermentação espontânea ocorreu tardiamente face às amostras inoculadas e os respetivos fermentados obtiveram classificações sensoriais depreciativas ao nível do aroma.
- A eficiência da descontaminação do TT dos frutos em inteiro (100 °C / 1 min.) conduziu apenas a uma diminuição marginal da microbiota presente na matéria-prima (BAL e B&L), pelo que o desenvolvimento de outros microrganismos autóctones (por exemplo, leveduras) pode ter influenciado o comportamento dos fermentados inoculados. A falta de reprodutibilidade obtida quanto à eficiência de descontaminação poderá ser atribuída a problemas de escala uma vez que, neste ensaio, foi tratada uma maior quantidade de frutos. Este facto terá de ser tomado em consideração na posterior avaliação do comportamento de amostras inoculadas com culturas puras.

### 11.3. Fermentação controlada (2 estirpes de BAL alóctones) e efeito da adição de NaCl

#### Objetivos

- Estudar a influência da adição de 2,5% NaCl no processo fermentativo.
- Reavaliar a utilização de 2 estirpes alóctones de BAL como CS: C244 e a C1090, por terem apresentado, no ensaio anterior, a melhor e a pior *performance* fermentativa, respetivamente.

#### Metodologia

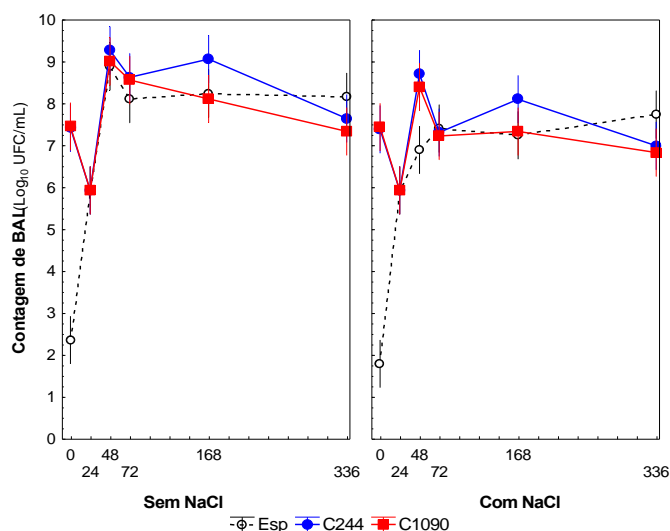
Um lote de  $\approx$  11 kg de frutos de TV das categorias verde e intermédio (na proporção 1:1) foi descongelado de forma faseada, submetido, em inteiro, a TT (100 °C / 1 min.) e homogeneizado (cf. 6.2). De seguida, as polpas foram divididas em dois grupos, tendo-se, num deles, adicionado 2,5% NaCl. Para os dois tipos de polpa, inoculou-se  $\approx$  33,3 mL das estirpes C244 e C1090 (uma por cada tipo de amostra), e, no caso das amostras controlo (fermentação espontânea – “Esp”), sem inoculação. Assim, prepararam-se 6 tipos de amostras (500 mL cada, em frascos de 1 L), em triplicado, identificadas consoante as diferentes condições: sem adição de NaCl como Esp, C244 e C1090; e com adição de 2,5% NaCl como Esp\_S, C244\_S e C1090\_S.

As amostras assim constituídas foram incubadas sob agitação orbital fraca (100 rpm) à temperatura de 28 °C durante 14 dias. Durante este período, foram retiradas alíquotas no dia 0 e ao fim de 24 h, 48 h, 72 h, 7 dias e 14 dias de armazenamento para avaliação de parâmetros microbiológicos (contagens de BAL e B&L; cf. 7.2.1 e 7.2.2, respetivamente) e físico-químicos (pH, AT, TSS, CFT, AOx e parâmetros CIELab). No último dia de armazenamento, foi efetuada uma análise sensorial das amostras fermentadas para avaliar os atributos da cor, consistência, aroma e apreciação global.

#### Contagens de BAL e B&L

As contagens médias de BAL ao longo do armazenamento (Figura 11.11) revelaram que o desenvolvimento da microbiota láctica e das estirpes inoculadas não foi influenciado pela adição de 2,5% NaCl. No tempo 0, a diferença de contagens de BAL entre as amostras controlo (ca. 2,1 log UFC/mL) e as amostras inoculadas (ca. 7,4 log UFC/mL, independentemente da estirpe) foi da ordem de ca. 5 ciclos log, independentemente da adição de NaCl, e é justificada pela adição de inóculo, 8 log UFC/mL, nas últimas.

## Ensaio de Fermentação



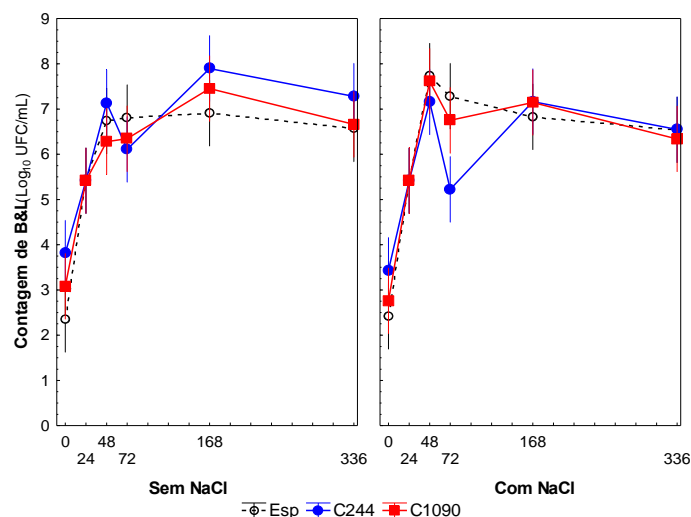
**Figura 11.11** | Variação nas contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras inoculadas (independentemente da estirpe e da adição de NaCl), verificou-se uma ligeira redução ( $p > 0,05$ ) nas contagens de BAL, de ca. 1,5 ciclos log, durante as primeiras 24 h de fermentação. No período subsequente (48 h), observou-se um aumento significativo, alcançando-se contagens de ca. 8,9 log UFC/mL, cujos montantes não registaram acréscimos significativos até ao final do período testado. Esta tendência de diminuição inicial poderá ter correspondido a uma fase de adaptação do inóculo. Tanto nas amostras inoculadas como nas amostras controlo, independentemente da adição de NaCl, foram alcançadas contagens elevadas de BAL ( $> 6,8$  log UFC/mL), assim como a respetiva manutenção ao longo do período testado. Estes resultados confirmam, mais uma vez, a aptidão de desenvolvimento deste grupo microbiano na matriz TV. As contagens iniciais (no dia 0) de BAL nas amostras controlo (Esp e Esp\_S), de ca. 2,1 log UFC/mL (face às contagens médias observadas na matéria-prima tratada termicamente de  $< 10$  UFC/mL e 4,5 log UFC/mL, nos ensaios 11.1 e 0, respetivamente), confirmaram que o TT dos frutos inteiros ( $100\text{ }^{\circ}\text{C} / 1\text{ min.}$ ) promove apenas uma descontaminação parcial deste grupo microbiano.

Neste ensaio, o comportamento dos fermentados inoculados com as estirpes C244 e C1090 foi muito semelhante, em contraste com o verificado no ensaio anterior, onde a estirpe C1090 não demonstrou um desenvolvimento expressivo durante o período testado.

O desenvolvimento do grupo B&L (Figura 11.12) também não foi influenciado pela adição de 2,5% NaCl, tendo-se observado contagens semelhantes ( $p > 0,05$ ) nos dois tipos de polpa ao longo das diferentes datas analisadas.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.12** | Variação nas contagens de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

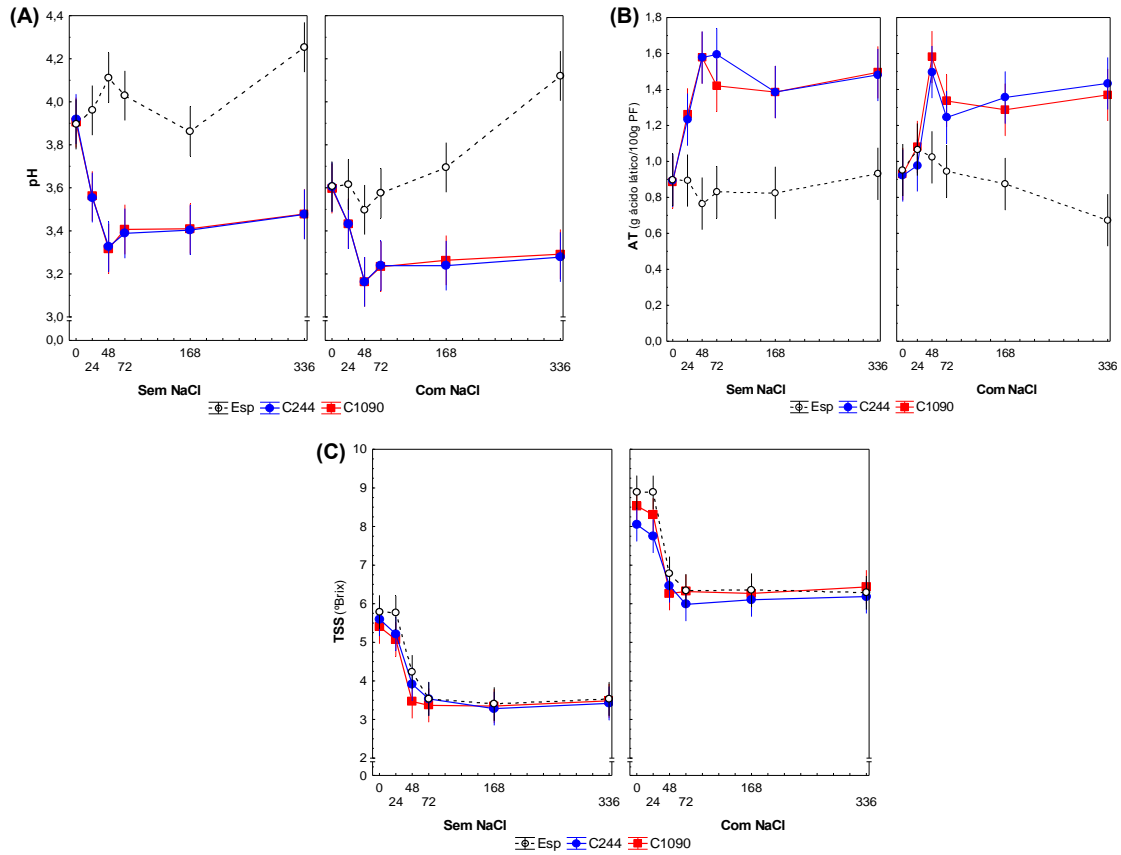
A evolução das contagens de B&L exibiu um comportamento idêntico para todos os tipos de amostra, sem diferenças significativas durante todo o período testado (com exceção da amostra C44\_S às 72 h, que contabilizou valores significativamente inferiores). Durante as primeiras 48 h de fermentação, verificou-se um aumento significativo nas contagens médias de B&L (ca. 4 ciclos Log), ao qual se seguiu uma estabilização dos respectivos valores até ao final do período testado, tendo-se alcançado valores finais  $> 6$  log UFC/mL em todas as amostras.

Neste ensaio, as contagens de B&L iniciais (no tempo 0) para todas as amostras, a variar entre 2,4 e 3,8 log UFC/mL, atestaram um efeito de descontaminação incipiente associado ao TT, quando comparado com o mesmo efeito alcançado no ensaio 11.1, no qual as amostras submetidas ao mesmo TT revelaram contagens muito inferiores ( $< 1$  ciclo log). Acresce que, no ensaio 11.1, a comparação entre amostras tratadas termicamente e amostras não tratadas (matéria-prima) foi associada a uma redução significativa de ca. 5 ciclos log. Estas diferenças poderão justificar-se pela quantidade de frutos submetida a TT em cada ensaio ( $\pm 4$  kg no ensaio 11.1 vs.  $\pm 11$  kg no ensaio 11.3). Embora a contabilização do tempo de TT (1 minuto) tenha início a partir do momento em que a temperatura da água de imersão alcança o valor de 100 °C, poderão estar envolvidos outros fatores (como a proporção de frutos face ao volume de água na autoclave) a influenciar os fenómenos de transferência de calor. Esta questão terá de ser tomada em consideração em futuros ensaios.

### Variação do pH, AT e TSS

As variações médias de pH e da AT das amostras em estudo durante o período de armazenamento, ilustradas nas Figura 11.13A-B (e Tabela VI.9, 0), traduzem a acidificação dos produtos fermentados.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.13** | Variação da (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

A evolução dos parâmetros pH e AT revelou-se muito distinta entre as amostras inoculadas e as amostras controlo (fermentação espontânea), independentemente da adição de NaCl. Durante as primeiras 48 h, intervalo coincidente ao período de fermentação, as amostras inoculadas (sem diferenças entre estirpes) manifestaram variações significativas na acidificação dos fermentados (redução média de 0,5 unidades e aumento médio de 0,7 g AL/100 g PF para o pH e a AT, respetivamente) face às amostras controlo, cujas variações nunca se mostraram significativas durante esse intervalo. Desta forma, os valores finais de pH e AT das amostras inoculadas (ca. 3,4 unidades de pH e ca. 1,5 g AL/100 g PF para a AT) diferiram significativamente face aos valores apresentados pelas amostras controlo (ca. 4,2 unidades de pH e 0,8 g AL/100 g PF para a AT).

No caso da fermentação espontânea (amostras controlo), houve uma manutenção dos valores de AT nas amostras sem adição de NaCl contrariamente ao caracterizado nos ensaios anteriores, nos quais foram sempre constatadas variações significativas na acidificação, ainda que tenham ocorrido tardiamente (ao fim de 168 h) comparativamente às amostras inoculadas. Neste ensaio, houve, ao invés, uma alcalinização significativa (ca. 0,5 unidades de pH) nas amostras controlo, onde os valores de pH final (ao fim de 336 h) foram superiores aos valores iniciais. Este comportamento poderá ser atribuído à aleatoriedade do tipo de fermentação que

## Ensaio de Fermentação

decorre quando não se adiciona inóculo e, no caso, ser atribuído ao grupo B&L e não ao desenvolvimento da microbiota láctica.

Relativamente à variação de TSS, ilustrada na Figura 11.13C (e Tabela VI.9, 0), observou-se, para todas as amostras (independentemente da adição de NaCl e/ou da estirpe inoculada), um padrão de evolução semelhante caracterizado por um decréscimo significativo nos valores de TSS, de ca. 1,8 °Brix, durante as primeiras 48 h de fermentação e que corresponde ao consumo de açúcares durante o desenvolvimento da microbiota. Após este período, verificou-se a respetiva manutenção de valores, sem variações adicionais, até ao final do período testado. É importante salientar que todas as amostras com adição de NaCl apresentaram valores de TSS superiores, em ca. 3 °Brix, face às suas congéneres sem adição de NaCl. Este desvio, que se manteve constante ao longo de todas as medições no período de armazenamento, reflete o efeito da adição de NaCl *per se* nas leituras refratométricas (Tabela VI.11, Anexo K –) e não um aumento real do TSS.

A avaliação dos resultados de pH, AT, TSS e contagem de BAL expressa uma aptidão fermentativa idêntica para as estirpes C244 e C1090, quer na presença como ausência de NaCl, tendo ambas sido caracterizadas por um aumento médio de AT de ca. 75% e uma diminuição média de pH e TSS de ca. 14% e 26%, respetivamente, ao fim de 48 h de fermentação, sem distinções significativas entre as duas estirpes ao longo do período testado. Estes resultados evidenciam, assim, uma diferença no comportamento fermentativo da estirpe C1090 entre ensaios. No ensaio anterior (ensaio 0), a estirpe C1090 não promoveu a acidificação do produto fermentado (caracterizado por um menor, e mais tardio, decréscimo de pH e sem aumento significativo de AT), indiciando, assim, uma menor aptidão de fermentar o TV, comparativamente à estirpe C244. Por outro lado, no presente ensaio, verificou-se um maior decréscimo de pH e TSS e um aumento da AT superior e mais rápido, face às amostras equivalentes do ensaio 0. Para além disto, no presente ensaio, não se observaram quaisquer diferenças significativas nas variações de pH, AT e TSS entre as duas estirpes, o que indicia uma semelhança nas suas *performances* fermentativas. Uma possível justificação para as diferenças de comportamento da estirpe C1090 entre ensaios pode ser a ativação tardia das suas vias metabólicas durante o ensaio 0 aquando da sua revitalização, o que resultou na sua menor capacidade fermentativa.

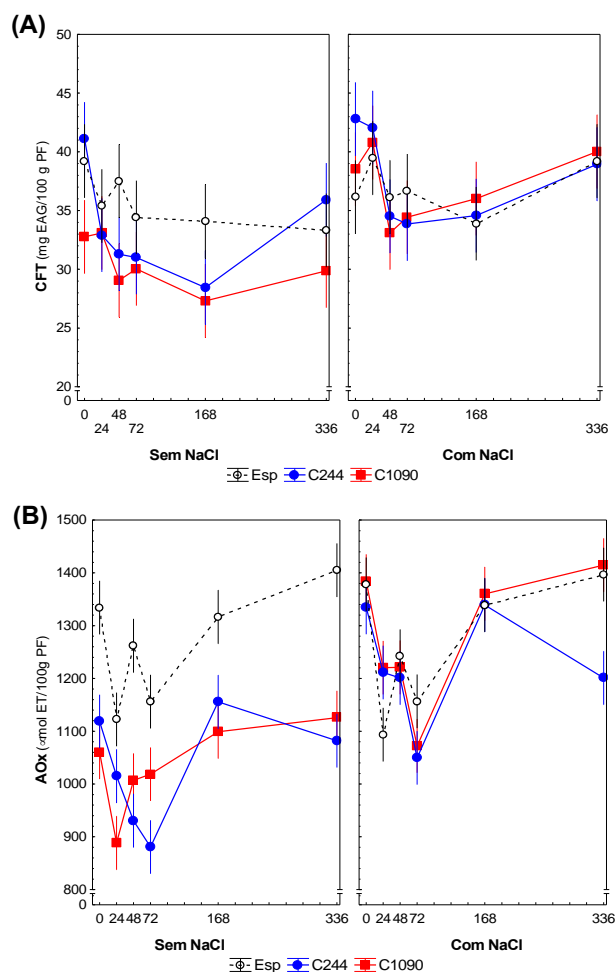
Em concordância com o presente ensaio, Khanna (2019) reportou que a adição de NaCl em concentrações inferiores a 2,5% não exerceu nenhum efeito significativo na variação de pH e AT durante a fermentação espontânea de chucrute (do alemão, *sauerkraut*). Em amostras de *tempoyak* fermentado espontaneamente<sup>168</sup> e de soja fermentada por *Bacillus subtilis*<sup>169</sup>, também não foram observados efeitos significativos da adição de NaCl na variação de pH.

### **Variação do CFT e AOx**

Os padrões evolutivos de CFT e AOx encontram-se ilustrados nas Figura 11.14A-B (e Tabela VI.10, 0). Durante o armazenamento, os valores de CFT e AOx das amostras sem adição de NaCl evoluíram de forma distinta, consoante o tipo de amostra. Por outro lado, as amostras

## Ensaio de Fermentação

com adição de NaCl exibiram um comportamento mais aproximado entre si, sem diferenças significativas entre amostras.



**Figura 11.14** | Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOX (μmol ET/100g PF) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

De forma geral, a adição de 2,5% NaCl não influenciou significativamente os valores de CFT ao longo do período testado (Figura 11.14A), tendo apenas provocado uma menor dispersão dos resultados entre amostras. Independentemente da adição de NaCl, a evolução de CFT ao longo do período testado consistiu numa tendência de diminuição ( $p > 0,05$ ) durante o período fermentativo, seguida de uma tendência de aumento ( $p > 0,05$ ) até ao fim do período de armazenamento. Apesar destas variações, os valores iniciais de CFT, que oscilaram entre 32,76 e 42,80 mg EAG/100 g PF, e os respetivos valores finais, que oscilaram entre 29, 87 e 40,03 mg EAG/100 g PF, não apresentaram diferenças significativas entre si. Ao fim de 14 dias de armazenamento, as amostras com adição de NaCl apresentaram valores de CFT ligeiramente superiores ( $p > 0,05$ ) face às respetivas amostras sem adição de NaCl (aumento de 8%, 18% e 34% para as amostras C244, Esp e C1090, respetivamente).

## Ensaio de Fermentação

A adição de 2,5% NaCl nas amostras inoculadas provocou um aumento ligeiro da AOx (11% e 26% para as estirpes C244 e C1090, respetivamente) ao fim de 336 h de armazenamento (Figura 11.14B), sendo considerado significativo apenas para as amostras C1090. A variação da AOx entre amostras sem NaCl exibiu padrões evolutivos distintos, enquanto as amostras com NaCl apresentaram uma menor dispersão de resultados. A evolução de AOx de todas as amostras ao longo do período testado exibiu um comportamento análogo ao do CFT, com uma tendência inicial de decréscimo ( $p > 0,05$ ), seguido de uma tendência de aumento ( $p > 0,05$ ) até ao final do período de armazenamento, onde foram alcançados valores finais idênticos aos respetivos valores iniciais.

Em amostras de tomate de diferentes variedades<sup>170,171</sup>, os teores de CFT e AOx durante a fermentação não sofreram alterações significativas pela adição de 50–80 mM NaCl. A adição de NaCl a amostras de rebentos de rabanete<sup>172</sup> e rebentos de brócolos<sup>173</sup> fermentados também não influenciou os teores de CFT.

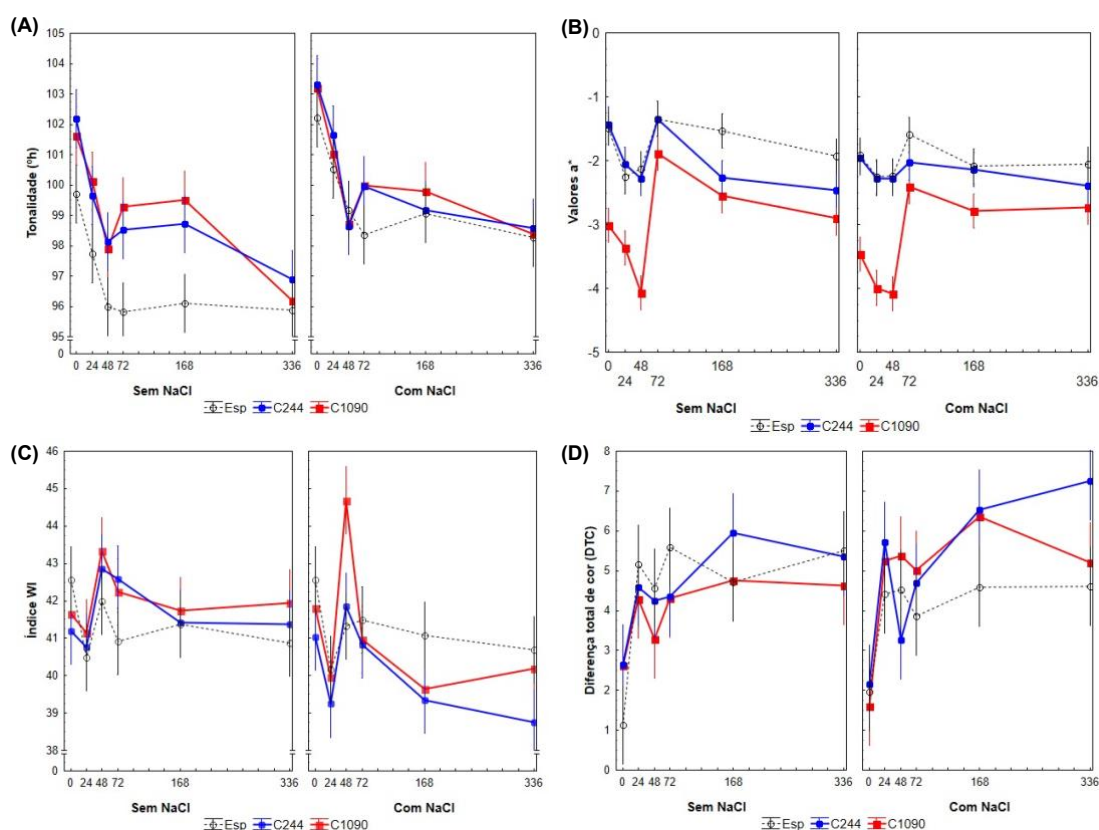
Obteve-se ainda uma correlação significativa e positiva entre o CFT e a AOx das polpas de TV, com um coeficiente de correlação de 0,51. Porém, é de notar que, na fermentação controlada (amostras inoculadas com as estirpes bacterianas), esta correlação foi ligeiramente superior, com um valor de  $r = 0,59$ , enquanto para a fermentação espontânea (amostras controlo) não foi verificada qualquer correlação (Tabela VI.12, Anexo L –). A correlação positiva entre CFT e AOx traduz que parte significativa da AOx das amostras pode ser atribuída à composição fenólica.

### Variação dos parâmetros CIELab

As variações dos parâmetros CIELab ( $^{\circ}h$ ,  $a^*$ , WI e DTC) das amostras fermentadas de polpa de TV na ausência e presença de NaCl estão ilustradas nas Figura 11.15A-D, respetivamente.

A alteração da tonalidade dos fermentados, expressa pelas variações de  $^{\circ}h$  (Figura 11.15A), caracterizou-se por um decréscimo significativo durante o período fermentativo (até às 48 h) e respetiva manutenção da tonalidade durante o período subsequente, independentemente da adição de NaCl. Contudo, a adição de NaCl influenciou significativamente a tonalidade das amostras controlo: as amostras Esp exibiram valores inferiores face às amostras C244 e C1090 durante todo o período testado (à exceção dos valores finais, semelhantes entre amostras), enquanto a tonalidade das amostras Esp\_S não denotou diferenças significativas relativamente às amostras C244\_S e C1090\_S. Ademais, a adição de 2,5% NaCl influenciou a manutenção da tonalidade das amostras, tendo provocado um ligeiro aumento nos valores finais de  $^{\circ}h$  ( $\Delta < 3$ ), não perceptível visualmente.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.15** | Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro  $a^*$ , (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e para as amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Para todas as amostras, o padrão evolutivo de WI (Figura 11.15C) revelou variações significativas ao longo do período de armazenamento. Durante as primeiras 72 h, todas as amostras denotaram variações inconsistentes: escurecimento até às 24 h, aclaramento no período 24–48 h e, novamente, escurecimento durante o intervalo 48–72 h. Após este período, denotou-se uma tendência de escurecimento ligeiro, até se alcançarem valores finais semelhantes aos iniciais. As amostras C244\_S constituíram uma exceção, ao revelarem níveis de escurecimento mais acentuados no final do período testado. O efeito da adição de NaCl foi marginal na evolução deste parâmetro, porém aumentou a diferença entre amostras. É importante ainda salientar que o aclaramento das amostras coincidiu, mais uma vez, com a acidificação dos fermentados.

De modo geral, a evolução de DTC foi idêntica para todas as amostras (Figura 11.15D) e caracterizou-se por uma tendência de aumento durante o período testado, com a principal variação da cor ( $p < 0,05$ ) a ocorrer logo ao fim de 24 h de fermentação (ca. 2,5 e 3,2 para amostras sem e com NaCl, respetivamente). Ao final de 14 dias, não foram observadas diferenças significativas entre amostras com e sem adição de NaCl, com valores superiores a 4,5 a traduzir variações muito distintas<sup>87</sup> (cf. Tabela 8.1). Assim, a adição de 2,5% NaCl não influenciou o padrão evolutivo de DTC, apenas acentuou a alteração da cor.

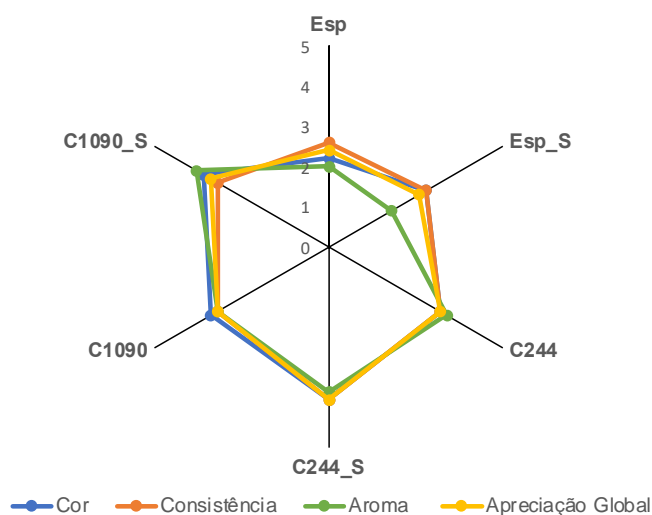
## Ensaio de Fermentação

A relação de DTC com os parâmetros  $a^*$ ,  $^{\circ}h$  e WI (Tabela VI.13, Anexo L –) expressou as seguintes correlações:  $r = 0,56$  para  $a^*$ ,  $r = -0,33$  para  $^{\circ}h$  e  $r = -0,40$  para WI. Deste modo, a perda da tonalidade verde inicial e o escurecimento foram os principais responsáveis pela alteração da cor das amostras durante o período testado.

Tal como verificado no presente estudo, tanto em amostras de azeitona verde Aloreña fermentadas espontaneamente com adição de NaCl (e outras misturas de sais)<sup>174</sup> como em amostras de azeitona (*Olea europaea*) fermentadas por *L. plantarum* na presença e ausência de NaCl<sup>175</sup>, não foram reportadas alterações significativas nos seus parâmetros colorimétricos.

### Análise sensorial

A avaliação sensorial dos fermentados de TV (Figura 11.16) foi realizada apenas no último dia de armazenamento por um painel de provadores que classificou os seus atributos da cor, consistência, aroma e apreciação global segundo uma escala hedónica de 1 a 5 (cf. em 8.10).



**Figura 11.16** | Classificação média atribuída durante a avaliação sensorial da cor, consistência, aroma e apreciação global de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S) ao 14º dia de armazenamento.

Apesar da adição de 2,5% NaCl ter enaltecido algumas das características organolépticas dos fermentados (cor e aroma), principalmente nas amostras inoculadas, não se verificou influência marcada na apreciação sensorial das amostras e, em consequência, não se alterou o sentido da respetiva aceitação sensorial.

As amostras inoculadas obtiveram classificações  $\geq 3$  em todos os atributos, não existindo diferenças significativas entre as duas estirpes. De modo geral, embora as diferenças não sejam consideradas significativas, as amostras com adição de NaCl obtiveram classificações ligeiramente superiores face às respetivas amostras sem adição de NaCl para todos os atributos (cor, consistência e aroma). Particularmente, em nota de ficha de prova, os provadores descreveram aromas considerados agradáveis e perceção de aromas frutados para as amostras com NaCl. Inversamente, as amostras controlo, independentemente da adição de NaCl, obtiveram classificações inferiores às amostras inoculadas em todos os atributos avaliados,

## Ensaio de Fermentação

particularmente no aroma. Nestas, as classificações médias não superaram o valor de 3 em nenhum dos atributos, com particular destaque para a manifestação de aroma desagradável, contribuindo, assim, para a sua rejeição sensorial. Os provadores classificaram ainda todas as amostras segundo a sua apreciação global e as amostras controlo obtiveram classificações abaixo do limite de aceitação (< 3), enquanto as amostras inoculadas (sem diferenças significativas entre estirpes) obtiveram sempre classificações com valores médios superiores a 3. A amostra C244\_S foi eleita com a melhor classificação.

À semelhança do verificado no presente ensaio, Omafuvbe (2006) reportou que, em soja fermentada por *Bacillus subtilis*, embora não existissem diferenças significativas entre as propriedades organoléticas de amostras de soja fermentadas na presença e ausência de 1 % de NaCl, os provadores demonstraram uma preferência pelas primeiras.

### Considerações intercalares

- Nos fermentados de TV inoculados com culturas puras de *L. plantarum* (C244) e *W. paramesenteroides* (C1090), a adição de 2,5% NaCl não influenciou o desenvolvimento e a aptidão fermentativa das estirpes de BAL.
- Ao contrário do verificado no ensaio anterior, a estirpe C1090 apresentou uma aptidão fermentativa semelhante à estirpe C244.
- Nos fermentados, a elevada viabilidade das BAL (> 7 log UFC/mL) durante o total do armazenamento, independentemente da estirpe e da adição de NaCl, é favorável para a obtenção de um produto probiótico.
- Nos fermentados inoculados com a estirpe C244, não se verificou alteração significativa do CFT e AOx. Nos fermentados com a estirpe C1090, a adição de NaCl provocou um aumento dos valores de CFT e AOx.
- A cor dos fermentados não foi expressivamente influenciada pela adição de 2,5% NaCl. Já o desenvolvimento de aroma nas amostras fermentadas foi influenciado pela estirpe inoculada (estirpe C244 com classificações mais elevadas) e pela adição de NaCl (classificações mais elevadas), mas sem alteração do sentido de aceitação sensorial das amostras (aceitação/rejeição).
- Nas amostras onde decorreu a fermentação espontânea, independentemente da adição de NaCl, não se verificou acidificação do meio, apesar de se ter verificado diminuição significativa de sólidos solúveis e desenvolvimento da microbiota láctica. Mais uma vez, constatou-se o desenvolvimento de aromas indesejáveis a comprometer a aceitação global destes fermentados.

## 11.4. Fermentação controlada (2 estirpes de BAL com potencial probiótico *in vitro*)

### Objetivos

Testar a *performance* fermentativa de 2 estirpes de BAL com potencial probiótico *in vitro* (C1090 e BAL97) como CS na fermentação de TV.

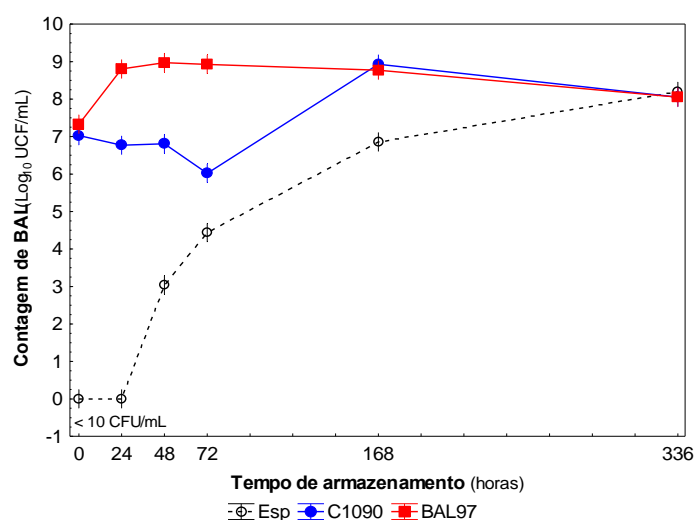
### Metodologia

Um lote de  $\approx 7$  kg de frutos de TV das categorias verde e intermédio (na proporção 1:1) armazenados ( $-20$  °C) foi descongelado faseadamente, homogeneizado com adição de 2,5% NaCl (cf. 6.2) e posteriormente tratado termicamente ( $110$  °C durante 2 minutos). A partir das polpas preparadas, constituíram-se 3 tipos de amostras (500 mL cada, em frascos de 1 L), em triplicado: amostra controlo, sem inoculação de estirpes (Id: Esp), e 2 tipos de amostras inoculadas individualmente ( $\approx 13,3$  mL de inóculo) com as estirpes C1090 e BAL97, cuja identificação remete para a estirpe inoculada (Id: C1090 e BAL97, respetivamente).

Todas as amostras foram incubadas sob agitação orbital fraca (100 rpm) à temperatura de  $28$  °C, durante 14 dias. No curso do processo, foram retiradas alíquotas de cada amostra no dia 0 e ao final dos períodos de 24 h, 48 h, 72 h, 7 e 14 dias para avaliação de parâmetros microbiológicos (contagens de BAL e B&L; cf. 7.2.1 e 7.2.2, respetivamente) e físico-químicos (pH, AT, TSS, parâmetros CIELab, CFT e AOx). No último dia de armazenamento, foi efetuada uma análise sensorial das amostras fermentadas para avaliar os atributos da cor, consistência, aroma, sabor e apreciação global.

### Contagens de BAL e B&L

As contagens médias de BAL das amostras (Figura 11.17) demonstraram, mais uma vez, a capacidade de desenvolvimento deste grupo bacteriano na matriz TV.

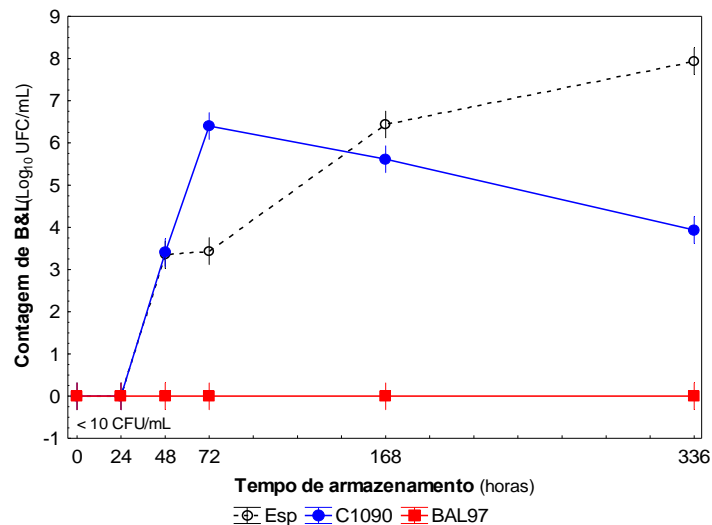


**Figura 11.17** | Variação das contagens médias de BAL (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

## Ensaio de Fermentação

A adição da estirpe (inóculo de 8 log UFC/mL) após o tratamento térmico das polpas justifica a diferença entre as contagens iniciais (ao tempo 0) das amostras controle e inoculadas. Em geral, as amostras inoculadas mantiveram as contagens (ca. 7,3 e 8,5 log UFC/mL para C1090 e BAL97, respetivamente) ao longo de todo o período testado. Na amostra controle, observaram-se contagens reduzidas (< 10 log UFC/mL) durante as primeiras 24 h devido ao TT aplicado. Após este período, verificou-se um aumento gradual ( $p < 0,05$ ) das contagens de BAL, até se atingirem valores de ca. 8,2 log UFC/mL no final do período testado.

A variação das contagens médias de B&L presentes nas amostras fermentadas de TV durante o período de 14 dias encontra-se ilustrada na Figura 11.18.



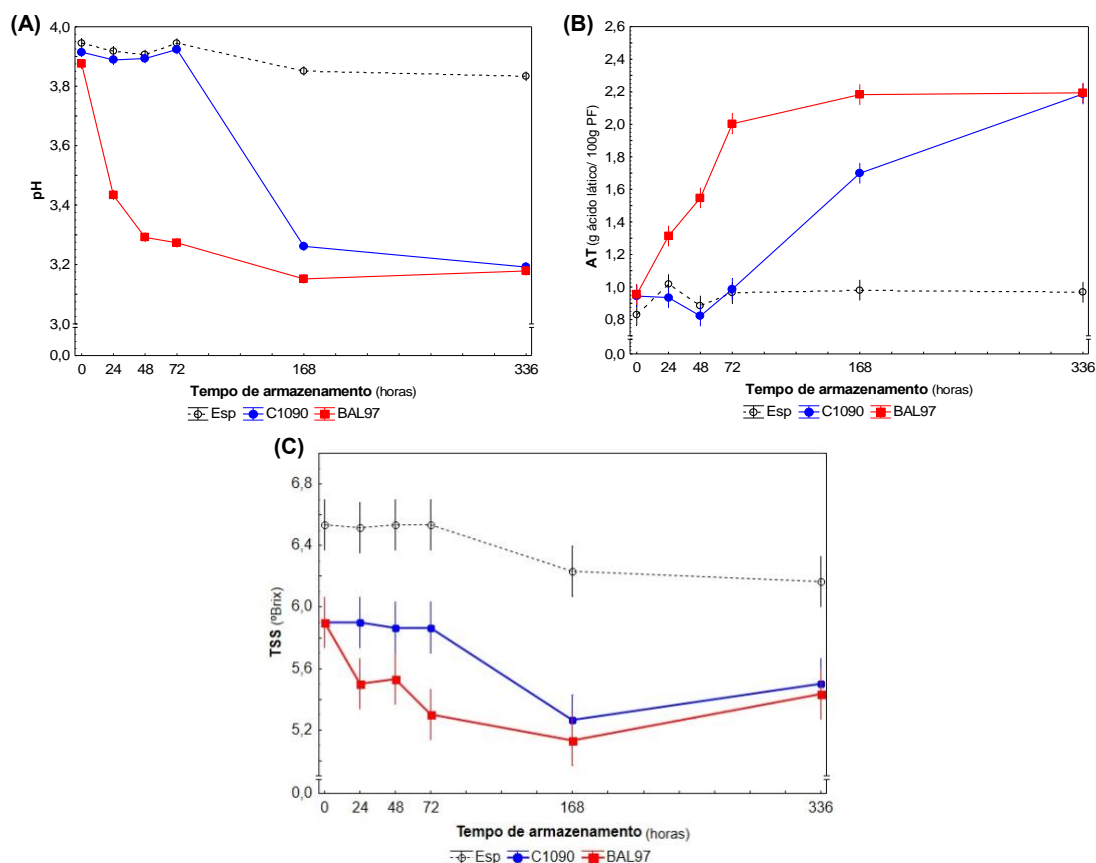
**Figura 11.18** | Variação das contagens médias de B&L (log UFC/mL) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

O TT aplicado foi eficaz na eliminação deste grupo microbiano, uma vez que se obtiveram contagens muito baixas (< 10 log UFC/mL) em todas as amostras, que se mantiveram durante as primeiras 24 h de fermentação. A amostra BAL97 manteve estas contagens durante todo o período testado, enquanto nas amostras Esp e C1090, após o período inicial de 24 h, observou-se um aumento significativo de B&L, alcançando valores finais de 7,9 e 3,9 log UFC/mL, respetivamente. A ausência de desenvolvimento do grupo B&L nas amostras BAL97 pode ser justificado pelo maior desenvolvimento de BAL nas mesmas, enquanto grupo dominante e mais competitivo pelos nutrientes.

### Varição do pH, AT e TSS

As variações de pH e AT, ilustradas nas Figura 11.19A-B (e Tabela VI.14, 0), evidenciaram as diferentes *performances* fermentativas das estirpes bacterianas.

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.19** | Variação da (A) pH, (B) AT (g AL/100g PF) e (C) TSS (°Brix) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo procedimento de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras BAL97, verificou-se uma diminuição significativa de pH (ca. 0,5 unidades) ao fim de 24 h, que continuou gradualmente ( $p < 0,05$ ) até às 168 h de armazenamento. Por outro lado, nas amostras C1090, verificou-se que a diminuição significativa de pH (ca. 0,7 unidades) ocorreu mais tarde, ao fim de 168 h. Após este período, o pH de ambas as amostras não registou variações adicionais até ao final do período testado (ca. 3,2), sem diferenças significativas entre si. A variação de AT (em sentido inverso) revelou um comportamento semelhante, com a estirpe BAL97 a acidificar o meio mais rapidamente face à estirpe C1090. Para BAL97, observaram-se aumentos significativos e graduais desde o início da fermentação até às 168 h de armazenamento (ca. 1,2 g AL/100 g PF), enquanto para a estirpe C1090 apenas se observaram aumentos significativos ao fim de 168 h (ca. 0,8 g AL/100 g PF). Independentemente dos diferentes comportamentos fermentativos, os valores finais de AT, ca. 2,2 g AL/100 g PF, não diferiram entre estirpes ( $p > 0,05$ ).

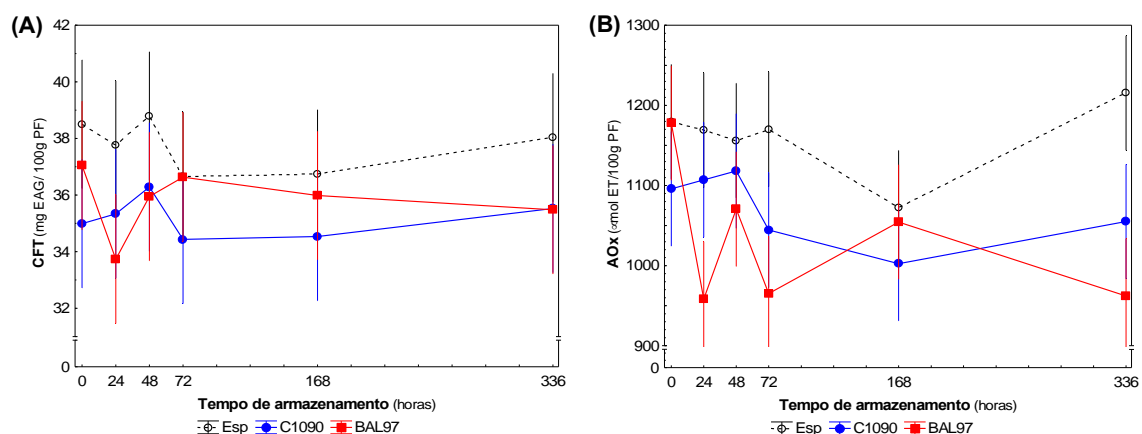
Por sua vez, a amostra controlo não exibiu variações significativas de pH e AT durante todo o período testado, apresentando valores médios de 3,9 unidades e 0,9 g AL/100 g PF, respetivamente. Estes resultados diferem dos observados em ensaios anteriores para o mesmo tipo de amostra, pelo que comprovam, novamente, a falta de reprodutibilidade da fermentação espontânea.

## Ensaio de Fermentação

Quanto à variação dos valores de TSS, ilustrada na Figura 11.19C (e Tabela VI.14, 0), as amostras BAL97 denotaram uma diminuição significativa de TSS ao fim de 24 h (ca. 0,4 °Brix), atingindo valores mínimos ao fim de 168 h (ca. 5,1 °Brix). Nas amostras C1090, verificou-se um atraso no consumo de TSS, com diminuição significativa, de ca. 0,6 °Brix, apenas ao fim de 168 h. Para a amostra controle, os valores de TSS não sofreram variações significativas ao longo do período testado.

### Variação do CFT e AOx

As variações de CFT e AOx das amostras encontram-se ilustradas nas Figura 11.20A-B (e Tabela VI.14, 0).



**Figura 11.20** | Variação do (A) CFT (mg EAG/100g PF) e da (B) AOx (µmol ET/100g PF) de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

O CFT das amostras ao longo do período testado, apresentado na Figura 11.20A, mostra que a evolução dos respectivos valores não diferiu significativamente entre tipos de amostras, tendo-se alcançado valores médios de ca. 36,2 mg EAG/100 g PF ao fim de 14 dias de armazenamento, semelhantes aos valores iniciais.

A avaliação da AOx ao longo do período testado exibiu comportamentos diferentes consoante o tipo de amostras (Figura 11.20B). Nas amostras Esp e C1090, as variações ao longo do período testado nunca foram significativas, com valores finais semelhantes aos iniciais (ca. 1160,5 e 1070,5 µmol ET/100 g PF, respetivamente). As amostras BAL97 revelaram-se uma exceção a este comportamento, com um decréscimo significativo da AOx ao fim de 24 h e contabilizando, no final, valores de 962,1 µmol ET/100 g PF, inferiores ( $p < 0,05$ ) aos iniciais. No final do armazenamento, estas amostras contabilizaram valores inferiores relativamente às restantes, diferença essa que foi significativa face à amostra Esp (17%).

Entre todas as amostras, obteve-se ainda uma correlação significativa e positiva entre o CFT e a AOx, com um valor de  $r = 0,75$  (Tabela VI.15, 0). Tal como mencionado na discussão anterior (ensaio 10.1), diversos estudos relataram correlações significativas e positivas entre CFT de extratos de tomate e os respectivos valores de AOx:  $r = 0,94^{110}$ ;  $r = 0,73^{111}$ ;  $r = 0,84^{112}$ . Assim,

## Ensaio de Fermentação

a correlação positiva mais baixa, obtida neste ensaio, permite especular que apesar dos fenólicos serem os principais responsáveis pela AOx, haverá igualmente outros compostos envolvidos na AOx das amostras.

A bibliografia relativa à variação da composição fenólica e da atividade antioxidante de produtos fermentados de origem vegetal, e para uma diversidade de estirpes como CS, expressa tendências muito diversificadas. Com efeito, são referidos casos de aumento, diminuição ou manutenção dos teores iniciais durante os períodos de fermentação e armazenamento. Yang et al. (2018) relataram que a utilização de *L. plantarum* na fermentação de sumo de maçã conduziu a uma diminuição significativa do CFT durante o armazenamento. A mesma tendência foi reportada para a fermentação de sumo de papaia<sup>177</sup> e de azeitonas<sup>178</sup> com utilização de estirpes de *L. plantarum*. Inversamente, foram verificados ligeiros aumentos no CFT em sumo de tomate fermentado por *L. plantarum* e *L. casei*<sup>52</sup>. Já em sumo de pêra (*Opuntia* sp., cv. "skinners court") fermentado por *L. fermentum*, não foram observadas variações significativas no CFT durante um período de 48 h<sup>179</sup>. Concretamente, em sumo de tomate fermentado quer por *L. casei* e *L. plantarum*<sup>52</sup> quer por outras espécies de BAL<sup>180</sup>, são referidos valores de CFT entre 17–20 mg EAG/100 g e 19–37 mg EAG/100 g, respetivamente, próximo da gama avaliada nas amostras em estudo.

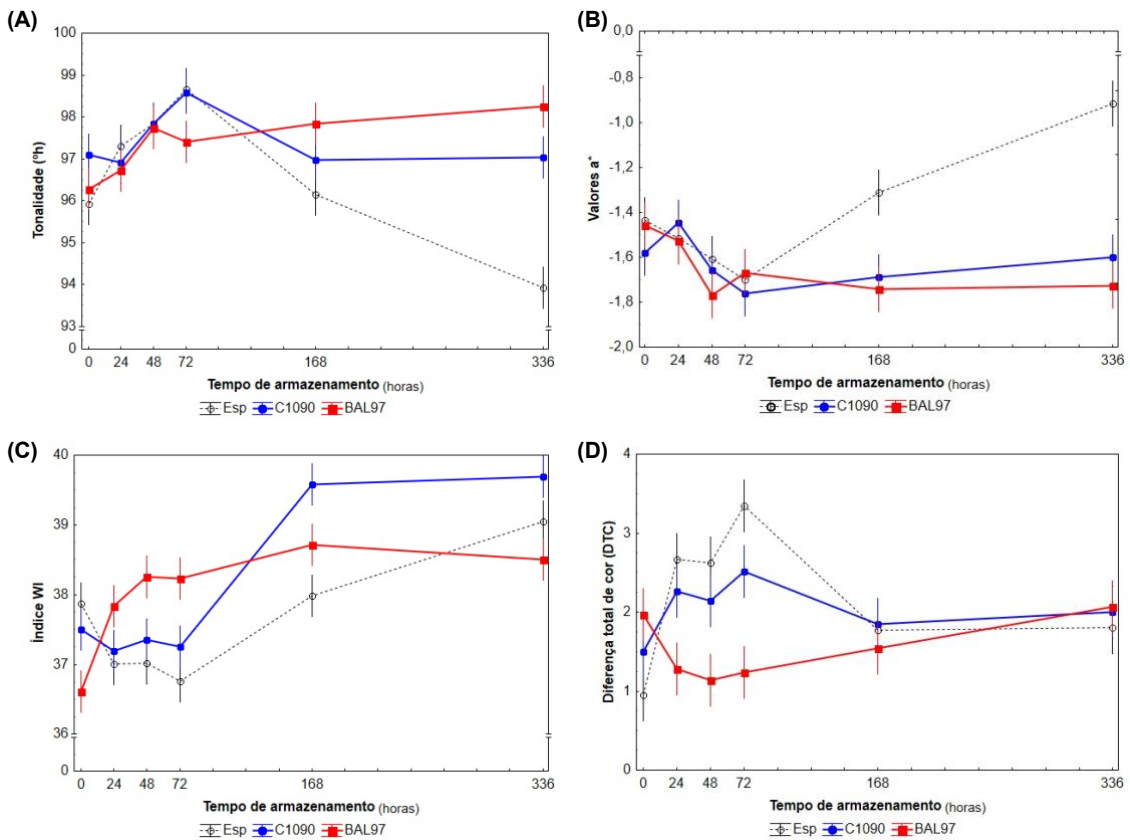
Chen et al. (2018) reportaram tendências de variação opostas na avaliação da AOx de sumo de papaia fermentado na dependência da estirpe utilizada como CS: a utilização de *L. acidophilus* provocou um decréscimo significativo de AOx, enquanto a utilização de *L. plantarum* provocou um ligeiro aumento. Um aumento ligeiro foi igualmente observado para azeitonas fermentadas com estirpes de *L. plantarum*<sup>178</sup>. Para sumo de tomate<sup>52</sup> e sumo de amora<sup>165</sup> fermentados com diversas estirpes de BAL, nomeadamente *L. plantarum*, foram reportados aumentos significativos de AOx durante a fermentação. O aumento da AOx em alimentos fermentados pode ser atribuído à acumulação de compostos antioxidantes, incluindo compostos fenólicos, flavonoides e enzima superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)<sup>181</sup>.

A informação disponível sobre a influência de compostos fenólicos no desenvolvimento e viabilidade das BAL é ainda escassa, sendo que as vias metabólicas de biossíntese ou degradação de compostos fenólicos pela população de BAL ainda não foram totalmente esclarecidas<sup>182</sup>. No entanto, a transformação microbiana e a despolimerização de compostos fenólicos de elevado peso molecular podem, nalguns casos, justificar os aumentos do CFT que se verificam durante a fermentação<sup>183</sup>. Por outro lado, verifica-se que o efeito bacteriostático exercido por elevadas concentrações de compostos fenólicos sobre a população de BAL pode ser superado através de mecanismos próprios de adaptação que, ao promover a degradação fenólica, garantem a continuidade do desenvolvimento das BAL. Este mecanismo pode, assim, justificar a diminuição do CFT durante a fermentação de HF<sup>182</sup>. Em suma, a interação entre a população de BAL e os fenólicos alimentares é altamente dependente da natureza e da quantidade de compostos fenólicos presentes na matéria-prima fermentada, bem como das estirpes envolvidas no processo fermentativo.

## Ensaio de Fermentação

### Varição dos parâmetros CIELab

As variações dos parâmetros CIELab ( $^{\circ}h$ ,  $a^*$ , WI e DTC) das amostras fermentadas de TV estão ilustradas nas Figura 11.21A-D, respetivamente.



**Figura 11.21 |** Variação dos valores médios dos parâmetros instrumentais da cor – (A) Tonalidade, (B) Parâmetro  $a^*$ , (C) Índice WI e (D) Diferença total de cor – para as amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp), durante 14 dias. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA fatorial e a comparação de pares das médias amostrais foi obtida pelo teste de Tukey com  $p = 0,05$ . As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95%.

A tonalidade de todas as amostras, expressa pelas variações de  $^{\circ}h$  (Figura 11.21A), revelou uma tendência de aumento durante as primeiras 48 h, não denotando, porém, variações significativas entre amostras. A partir deste período, as amostras BAL97 conservaram a tonalidade até ao final da avaliação. No entanto, para as amostras Esp e C1090, no período subsequente (48 – 72 h), manteve-se a tendência de aumento dos valores de  $^{\circ}h$  (alcançando-se valores máximos e semelhantes entre si), seguido de uma diminuição para o final do armazenamento, mais acentuada nas amostras controlo. No final do período testado, as diferenças de tonalidade entre amostras foram significativas. Contudo, só as diferenças entre a amostra controlo e as amostras inoculadas foram percebidas visualmente ( $\Delta^{\circ}h \geq 3$ ).

Para todas as amostras, o parâmetro  $a^*$  (Figura 11.21B) apresentou valores negativos e semelhantes entre si durante as primeiras 72 h. A partir deste período, as amostras controlo verificaram aumentos significativos de  $a^*$  (perda da tonalidade verde), enquanto as amostras C1090 e BAL97 mantiveram valores semelhantes e sem variações adicionais até ao final do ensaio.

## Ensaio de Fermentação

O índice WI revelou variações significativas entre amostras ao longo do período de armazenamento (Figura 11.21C). As amostras BAL97 denotaram um aumento significativo dos valores de WI ao fim de 24 h, o que se traduziu no respetivo aclaramento e que se manteve sem variações adicionais até ao final do ensaio. Inversamente, a amostra Esp revelou uma tendência de escurecimento (diminuição dos valores de WI) significativo no período inicial de 24 h, manutenção até às 72 h e o aumento dos níveis de aclaramento até ao final do ensaio, alcançando valores finais semelhantes aos das restantes amostras. Nas amostras C1090, não se verificaram variações significativas nos níveis de escurecimento durante as primeiras 72 h, tendo-se observado níveis superiores de aclaramento nos períodos posteriores. Faz-se notar que a evolução deste índice acompanhou as variações na acidificação dos respetivos fermentados (correlações significativas com pH ( $r = -0,69$ ) e AT ( $r = 0,66$ )), salientando, novamente, um possível efeito de inibição enzimática da PPO em ambiente ácido ( $\text{pH} < 4$ ).

Nas amostras inoculadas BAL97 e C1090, a DTC (Figura 11.21D) não excedeu uma unidade de variação (ca. 0,1 e 0,5, respetivamente) durante o total do período, traduzindo pequenas variações de  $\text{cor}^{87}$  (cf. Tabela 8.1). Por outro lado, na amostra Esp, a DTC alcançou valores superiores a 3 ( $t = 72$  h), expressando, assim, variações de cor consideradas distintas de acordo com a mesma classificação.

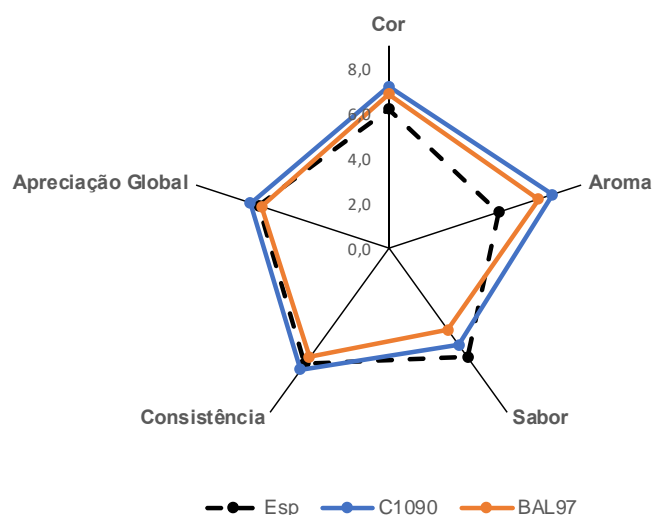
Das correlações entre os valores de  $a^*$ ,  $^{\circ}\text{h}$ , WI e DTC (Tabela VI.16, Anexo M –), verificou-se que o parâmetro  $a^*$  correlacionou-se significativamente com tonalidade ( $r = -0,92$ ), enquanto o DTC correlacionou-se significativamente com a tonalidade ( $r = 0,43$ ) e o WI ( $r = -0,45$ ). No caso, e tal como verificado nos ensaios anteriores, o escurecimento e a perda de tonalidade verde inicial foram as principais alterações da cor das amostras,

### Análise sensorial

A avaliação sensorial dos fermentados (Figura 11.22) foi realizada apenas no último dia de armazenamento por um painel de provadores que classificou os seus atributos da cor, aroma, sabor, consistência e apreciação global segundo uma escala hedónica de 1 a 9 (cf. em 8.10).

As amostras inoculadas obtiveram classificações positivas ( $> 5$ ) em todos os atributos avaliados (à exceção do sabor para a amostra BAL97), não verificando diferenças significativas entre si. A amostra C1090 destacou-se pela positiva relativamente à sua aparência, cor e aroma (descrito como frutado), enquanto a amostra BAL97 foi notada pelo excesso de acidez. A amostra C1090 foi a mais apreciada pelos provadores por corresponder a um equilíbrio entre os atributos cor, aroma e sabor. A amostra Esp, apesar de ter obtido classificações positivas para todos os atributos, foi penalizada pelos provadores devido à cor mais escura e ao aroma percebido como mais desagradável (menos aromático e frutado).

## Ensaio de Fermentação



**Figura 11.22** | Classificações médias atribuídas durante a avaliação sensorial da cor, aroma, sabor, consistência e apreciação global de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp) ao 14º dia de armazenamento.

No estudo de Di Cagno et al. (2009) sobre sumo de tomate fermentado, foi demonstrado que a utilização de *L. plantarum* dá origem a diferentes perfis aromáticos dependendo do tipo da estirpe utilizada, bem como da sua origem (nativa ou alóctone). Esta especificidade associada à estirpe utilizada como CS demonstra a importância da seleção das estirpes para alcançar um produto sensorial aceitável<sup>44</sup>.

### Aumento de escala (*scale up*)

Após a realização deste ensaio, todas as amostras inoculadas foram novamente preparadas em quantidades mais elevadas (5 L) e enviadas para uma empresa industrial, com o intuito de avaliar o seu comportamento fermentativo numa escala superior e de realizar formulações para o protótipo do produto final. Contudo, até à data, ainda não foram comunicadas quaisquer conclusões.

### Considerações intercalares

- Os fermentados inoculados com a estirpe BAL97 manifestaram uma melhor *performance* fermentativa pela maior rapidez de acidificação, face à estirpe C1090.
- Ambos fermentados inoculados foram sensorialmente aceites, tendo-se destacado os fermentados inoculados com a estirpe C1090 com classificações máximas atribuídas à cor, sabor e aroma frutado.
- O escurecimento e a perda da tonalidade verde inicial foram as principais alterações da cor dos fermentados.
- Os valores de CFT e AOx não sofreram variações significativas durante o período testado, independentemente do tipo de amostra, mantendo níveis médios de ca. 36,2 mg EAG/100 g PF e 1064,4 ET/100 g PF, respetivamente.

## IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 12. Conclusões gerais

---

O tomate-indústria não amadurecido (TV), cv. H1015, demonstrou constituir um substrato viável na fermentação láctica quer de forma natural (espontânea) quer pela introdução de inóculos de bactérias do ácido láctico (BAL) enquanto culturas *starter*.

Com vista à seleção de culturas *starter*, foram isoladas, caracterizadas e identificadas (bioquímica e molecularmente) estirpes da microbiota láctica do TV e da coleção do INIAV, confirmando-se que:

- As estirpes de BAL predominantes no TV pertencem aos géneros *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, tendo sido selecionadas como potenciais *starters* as estirpes *W. cibaria*, *L. plantarum*, *L. citreum*, *L. lactis* e *W. confusa*, com garantia *a priori* da necessária adaptação à matriz.
- Da coleção do INIAV, caracterizou-se e confirmou-se a identidade de duas estirpes – *L. plantarum* e *W. paramesenteroides* – com aptidão no processo fermentativo de TV.

Da avaliação do potencial probiótico *in vitro* e da tolerância a elevadas concentrações de solanina ao conjunto de nove estirpes de BAL (2 alóctones e 7 autóctones), conclui-se que:

- As estirpes *W. paramesenteroides* (alóctone) e *L. plantarum* (autóctone) foram as únicas estirpes que resistiram, simultaneamente, às condições de pH ácido e presença de sais biliares (simulação de condições gastrointestinais), mantendo a viabilidade (> 7 log UFC/mL) exigida para considerá-las com potencial probiótico *in vitro*.
- A adição de solanina (200 ppm) não influenciou o desenvolvimento das estirpes testadas, demonstrando a respetiva tolerância a este alcaloide.

Dos testes de fermentação (controlada vs. espontânea), concluiu-se que:

- A utilização de culturas *starter* no processo de fermentação assinalou diversas vantagens face à fermentação espontânea, nomeadamente maior eficiência e reprodutibilidade no processo. As estirpes de BAL testadas nas polpas de TV promoveram uma acidificação mais rápida do meio e originaram fermentados com melhor aceitação sensorial, face aos produtos fermentados espontaneamente. Nestes, o desenvolvimento da cor (mais escura) e, por vezes, de aromas desagradáveis comprometeram a respetiva aceitação sensorial.
- A variação da cor após fermentação manifestou-se pela perda da tonalidade verde e pelo escurecimento das polpas iniciais. Estas variações mostraram ser dependentes do metabolismo bacteriano e, em particular, do nível de acidificação dos fermentados. Nos fermentados inoculados, a acidificação mais acentuada e mais rápida atuou como fator anti-escurecimento.

## Considerações Finais

- Verificou-se a manutenção da composição bioativa de interesse alimentar (avaliada através do CFT e da AOx) durante o período fermentativo e tempo de armazenamento (14 dias) face aos teores contabilizados na matéria-prima.
- A adição de NaCl (2,5 %) provocou um efeito marginal no processo fermentativo. Contudo, a sua adição pode revelar-se vantajosa por enaltecer os atributos sensoriais (como o sabor), por aumentar a capacidade de conservação dos fermentados e pelo aumento da biodisponibilidade de compostos bioativos.
- Os fermentados de TV produzidos com as estirpes de BAL com potencial probiótico *in vitro* (*W. paramesenteroides* alóctone e *L. plantarum* autóctone) constituem um ingrediente de base para a formulação de molhos, sensorialmente apelativos (aparência, aroma e sabor), com composição bioativa de interesse alimentar e com potencialidades probióticas. Assim, confirmou-se a viabilidade desta estratégia na valorização de frutos não amadurecidos de tomate-indústria atualmente desaproveitados (economia circular) e como um contributo para a diversificação da oferta de fermentados de origem vegetal.

## 13. Divulgação

---

- Comunicação em painel, intitulada “***Inoculated fermentation of immature-tomato with potential probiotic Lactiplantibacillus plantarum and Weissella paramesenteroides starter cultures***”, no XV Encontro de Química dos Alimentos, realizado no Funchal, Madeira entre 5 e 8 de setembro de 2021 (capítulo 0).
- Artigo científico, intitulado “***Selection of autochthonous LAB strains of unripe green tomato towards the production of highly nutritious ingredients***”, publicado na revista científica *Foods*<sup>184</sup> (capítulo 10). Doi: <https://doi.org/10.3390/foods10122916>.
- Elaboração do artigo científico em fase de conclusão, com o título provisório “***Inoculated fermentation of unripe green tomato with potential probiotic Lactiplantibacillus plantarum and Weissella paramesenteroides starter cultures strains towards the production of highly nutritious ingredients***” (capítulo 0).

## 14. Perspetivas futuras

---

Em continuidade deste trabalho, perspetiva-se o aprofundamento dos seguintes tópicos:

- Continuação da avaliação das características probióticas das estirpes de BAL selecionadas com potencial probiótico *in vitro*. Preveem-se estudos como a avaliação da capacidade de adesão das estirpes às células epiteliais do intestino, da tolerância a enzimas pancreáticas, da hidrofobicidade da superfície celular e de auto-agregação celular, entre outros.
- Doseamento qualitativo e quantitativo do perfil de compostos fenólicos, de ácidos orgânicos (HPLC) e de compostos aromáticos (CG-MS) nos fermentados de tomate-indústria não amadurecido, de modo a pormenorizar a respetiva caracterização em função das culturas *starter* utilizadas.

## Considerações Finais

- Determinação do teor de glicoalcaloides (solanina e tomatina) nos fermentados de tomate-indústria não amadurecido (HPLC), com vista a garantir a segurança deste ingrediente e ainda como forma de testar a hipótese de que a fermentação láctica é, por si só, uma estratégia para a redução destes compostos.
- Testar a utilização de culturas *starter* mistas na fermentação de TV, incluindo consórcios com diferentes estirpes de BAL e/ou consórcios de BAL e leveduras, com vista à diversificação dos perfis aromáticos dos fermentados.
- Formulação de alimentos funcionais (molhos e temperos) com base no ingrediente obtido.



## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pintado, M. E. & Teixeira, J. A. Valorização de subprodutos da indústria alimentar: Obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*, **2015**.
2. Comissão Nacional de Combate ao Desperdício Alimentar (CNCDA). Estratégia Nacional e Plano de Ação de Combate ao Desperdício Alimentar, **2017**.
3. Food and Agriculture Organization (FAO). Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention, **2011**.
4. Hadj Saadoun, J. *et al.* Fermentation of agri-food waste: A promising route for the production of aroma compounds. *Foods*, **2021**, *10*, 1–14. doi: 10.3390/foods10040707.
5. Hadj Saadoun, J. *et al.* Lipid profile and growth of black soldier flies (*Hermetia illucens*, Stratiomyidae) reared on by-products from different food chains. *J. Sci. Food Agric.*, **2020**, *100(9)*, 3648–3657. doi: 10.1002/jsfa.10397.
6. European Commission. EU agricultural outlook for markets, income and environment 2020 - 2030. **2020**. doi: 10.2762/252413..
7. Saavedra, T. M., Figueroa, G. A. & Cauhi, J. G. D. Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciência Rural*, **2017**, *47(3)*, 1–8. doi: 10.1590/0103-8478cr20160526.
8. Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.*, **2013**, *33*, 1–10. doi: 0.1016/j.fm.2012.09.003.
9. FAOSTAT. Agriculture holdings cultivated for the production of crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Acedido a 29 setembro 2021).
10. EUROSTAT. Agricultural production - crops. Disponível em: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural\\_production\\_-\\_crops#Fruit](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_crops#Fruit) (Acedido a 23 fevereiro 2020).
11. Løvdal, T. *et al.* Valorization of tomato surplus and waste fractions: A case study using Norway, Belgium, Poland, and Turkey as examples. *Foods*, **2019**, *8*, 1–21. doi: 10.3390/foods8070229.
12. Simões, S. *et al.* Improving nutritional quality of unripe tomato through fermentation by a consortium of yeast and lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, **2021**, 1–8. doi: 10.1002/jsfa.11476.
13. Parfitt, J., Barthel, M. & MacNaughton, S. Food waste within food supply chains: Quantification and potential for change to 2050. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **2010**, *365*, 3065–3081. doi: 10.1098/rstb.2010.0126.
14. Lu, Z., Wang, J., Gao, R., Ye, F. & Zhao, G. Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.*, **2019**. doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.020.
15. Li, Y., Wang, H., Zhang, Y. & Martin, C. Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? *Plant Cell Rep.*, **2018**, *37*, 1443–1450. doi: 10.1007/s00299-018-2283-8.
16. Montet, D., Ray, R. C. & Zakhia-Rozis, N. Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. In *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*, 1ª ed., CRC Press Bota Raton, **2015**, pp. 108–140.
17. Davies, J. N. & Hobson, G. E. The constituents of tomato fruit — the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1981**, *15(3)*, 205–280. doi: 10.1080/10408398109527317.

## Referências Bibliográficas

18. Siddiqui, M. W. *et al.* Dynamic Changes in Health-Promoting Properties and Eating Quality During Off-Vine Ripening of Tomatoes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2018**, *0*, 1–21. doi: 10.1111/1541-4337.12395.
19. Urbonaviciene, D., Viskelis, P., Bartkiene, E., Juodeikiene, G. & Vidmantiene, D. The use of lactic acid bacteria in the fermentation of fruits and vegetables — technological and functional properties. In *Biotechnology* (ed. Ekinici, D.), **2015**, pp. 135–164. doi: 10.5772/59938.
20. Chatterjee, A., Debnath, S. & Pal, H. Implication of urban agriculture and vertical farming for future sustainability. In *Urban Horticulture - Necessity of the Future* (ed. Solankey, S. S.), **2020**, pp. 1–11. doi: 10.5772/intechopen.91133.
21. Salunkhe, D. K., Jadhav, S. J. & Yu, M. H. Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes. *Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr.*, **1974**, *24*, 85–113. doi: 10.1007/BF01092727.
22. Quinet, M. *et al.* Tomato fruit development and metabolism. *Front. Plant Sci.*, **2019**, *10*, 1–23. doi: 10.3389/fpls.2019.01554.
23. Heuvelink, Ep. *Tomatoes*, 2<sup>a</sup> ed., CABI Publishing, **2018**, pp. 1–378.
24. Thengane, V. G. & Gawande, M. B. Arduino based tomato ripening stages monitoring system. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.*, **2018**, *7(1)*, 530–536. doi: 10.15680/IJIRSET.2017.0701013.
25. Cano, A., Acosta, M. & Arnao, M. B. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Postharvest Biol. Technol.*, **2003**, *28*, 59–65. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00141-2.
26. Gierson, D. & Kader, A. A. Fruit ripening and quality. In *The Tomato Crop*, 1<sup>a</sup> ed (eds. J. Atherton, J. & Rudich, J.), **1986**, pp. 241–280. doi: 10.1007/978-94-009-3137-4\_6.
27. Santos, R. *et al.* Development of a fermented green tomato base for dressings and sauces with high nutritional value. *Acta Hortic.*, **2019**, *1233*, 239–246. doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1233.33.
28. Helyes, L., Pék, Z. & Lugasi, A. Tomato fruit quality and content depend on stage of maturity. *HortScience*, **2006**, *41(6)*, 1400–1401. doi: 10.21273/hortsci.41.6.1400.
29. Knee, M. & Finger, F. L. NADP<sup>+</sup>-Malic Enzyme and Organic Acid Levels in Developing Tomato Fruits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **1992**, *117(5)*, 799–801. doi: 10.21273/jashs.117.5.799.
30. Žnidarčič, D. & Požrl, T. Comparative study of quality changes in tomato cv. 'Malike' (*Lycopersicon esculentum* Mill.) whilst stored at different temperatures. *Acta Agric. Slov.*, **2006**, *87(2)*, 235–243.
31. Friedman, M. Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, *63(13)*, 3323–3337. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00818.
32. Tamasi, G. *et al.* Characterization of nutraceutical components in tomato pulp, skin and locular gel. *Eur. Food Res. Technol.*, **2019**, *245*, 907–918. doi: 10.1007/s00217-019-03235-x.
33. Schrenk, D. *et al.* Risk assessment of glycoalkaloids in feed and food, in particular in potatoes and potato-derived products. *EFSA J.*, **2020**, *18(8)*, 1–190. doi:10.2903/j.efsa.2020.6222..
34. Friedman, M. Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50(21)*, 5751–5780. doi: 10.1021/jf020560c.
35. Gupta, S. & Abu-Ghannam, N. Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2012**, *52*, 183–199. doi: 10.1080/10408398.2010.499779.

## Referências Bibliográficas

36. Shah, N. N. & Singhal, R. S. Fermented fruits and vegetables. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, Elsevier B.V. (eds. Pandey, A., Sanromán, M. A., Du, G., Soccol, C. R. & Dussap, C.-G.), **2017**, pp. 45–89. doi: 10.1016/B978-0-444-63666-9.00003-0.
37. Sabater, C., Ruiz, L., Delgado, S., Ruas-Madiedo, P. & Margolles, A. Valorization of vegetable food waste and by-products through fermentation processes. *Front. Microbiol.*, **2020**, *11*, 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2020.581997.
38. Motarjemi, Y. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, **2002**, *75*, 213–229. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00709-7.
39. Cao, G., Ma, F., Xu, J. & Zhang, Y. Microbial community succession and toxic alkaloids change during fermentation of Huafeng Dan Yaomu. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2020**, *70(4)*, 318–325. doi: 10.1111/lam.13276.
40. Li, C. *et al.* Biotransformation of alkylamides and alkaloids by lactic acid bacteria strains isolated from *Zanthoxylum bungeanum* meal. *Bioresour. Technol.*, **2021**, *330*, 1–8. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124944.
41. Di Cagno, R., Filannino, P. & Gobbetti, M. Vegetable and fruit fermentation by lactic acid bacteria. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, John Wiley & Sons, Ltd. (eds. Mozzi, F., Raya, R. R. & Vignolo, G. M.), **2016**, pp. 216–230.
42. Garrison, A. T. & Huigens, R. W. Eradicating bacterial biofilms with natural products and their inspired analogues that operate through unique mechanisms. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2016**, *17(14)*, 1–8. doi: 10.2174/1568026617666161214150959.
43. Vinicius De Melo Pereira, G. *et al.* A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. *Food Rev. Int.*, **2020**, *36(2)*, 135–167. doi: 10.1080/87559129.2019.1630636.
44. Di Cagno, R. *et al.* Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *Int. J. Food Microbiol.*, **2009**, *128*, 473–483. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.017.
45. Garcia, C., Guerin, M., Souidi, K. & Remize, F. Lactic fermented fruit or vegetable juices: Past, present and future. *Beverages*, **2020**, *6(1)*, 1–31. doi: 10.3390/beverages6010008.
46. Gibbons, J. G. & Rinker, D. C. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2015**, *35*, 1–8. doi: 10.1016/j.gde.2015.07.003.
47. Li, Q. & Gänzle, M. G. Host-adapted lactobacilli in food fermentations: impact of metabolic traits of host adapted lactobacilli on food quality and human health. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2020**. doi: 10.1016/j.cofs.2020.02.002.
48. Di Cagno, R., Filannino, P. & Gobbetti, M. Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. *Int. J. Food Microbiol.*, **2017**, *248*, 56–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.014.
49. Jampaphaeng, K. *et al.* Microbiota dynamics and volatilome profile during stink bean fermentation (Sataw-Dong) with *Lactobacillus plantarum* KJ03 as a starter culture. *Food Microbiol.*, **2018**, *76*, 91–102. doi: 10.1016/j.fm.2018.04.012.
50. Goldoni, J. S. & Goldoni, C. L. Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas. In *Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos*, 1ª ed., vol. 4, (Edgard Blucher), **2001**, pp. 269–287.
51. Reina, L. D. *et al.* Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **2015**, *203*, 35–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.007.
52. Liu, Y. *et al.* Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*: Antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles. *Molecules*,

## Referências Bibliográficas

- 2018**, 23, 1–18. doi: 10.3390/molecules23092366.
53. Pongener, A., Sharma, S. & Purbey, S. K. Heat Treatment of Fruits and Vegetables. In *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, Elsevier Inc. (ed. Siddiqui, M. W.), **2018**, pp. 179–196. doi: 10.1016/b978-0-12-812698-1.00009-1.
  54. Brumatti, M. R. Estudo do tratamento térmico aplicado na produção do molho de tomate. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal, São Carlos, **2019**.
  55. Renard, C. M. G. C. & Maingonnat, J. F. Thermal processing of fruits and fruit juices. In *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues*, 2<sup>a</sup> ed. (ed. Sun, D.-W.), CRC Press Bota Raton, **2012**, pp. 413–438.
  56. Wiley, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J. & Prescott, L. *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*, 7<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Higher Education, **2008**.
  57. Soccol, C. R. *et al.* The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotechnol.*, **2010**, 48(4), 413–434.
  58. Terpou, A. *et al.* Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, **2019**, 11, 1–32. doi: 10.3390/nu11071591.
  59. Ahmad Mir, S., Raja, J. & FA, M. Fermented vegetables, a rich repository of beneficial probiotics - A review. *Ferment. Technol.*, **2018**, 7(1), 1–5. doi: 10.4172/2167-7972.1000150.
  60. Awaisheh, S. S., Haddadin, M. S. Y. & Robinson, R. K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. *Int. Dairy J.*, **2005**, 15(11), 1184–1190. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.11.003.
  61. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 73, 365–373. doi: 10.1093/ajcn/73.2.365s.
  62. ISO 7218:2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.*
  63. ISO 6887-1:2017. *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*
  64. ISO 15214:1998. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C.*
  65. ISO 21527-1:2008. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.*
  66. ISO 4833-1:2013. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.*
  67. ISO 6888-2:2021. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium.*
  68. ISO 4832:2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.*
  69. ISO 16649-1:2018. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli — Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.*
  70. Aguiar, T. D. de F. *et al.* Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. *Acta Veterinária Brasília*, **2012**, 6(2), 80–93.

## Referências Bibliográficas

71. Microbiologia. Exame a fresco. Disponível em: <http://microbiologia.comunidades.net/exame-a-fresco> (Acedido a 25 fevereiro 2021).
72. Pires, B. F. M. Acompanhamento das atividades do laboratório de microbiologia médica veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, **2013**.
73. Lucas, R. V. Estudo comparativo da microflora bacteriana de doentes portadores de próteses totais acrílicas mucosuportadas e implantosuportadas. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária, Instituto Superior de Ciências da saúde Egas Moniz, **2014**.
74. Oliveira, S. J. *Guia Bacteriológico Prático - Microbiologia Veterinária*, ed. ULBRA, **2000**.
75. Raugel, P.-J. BioMérieux. *Rapid Food Anal. Hyg. Monit.*, **1999**, 53–85. doi: 10.1007/978-3-642-58362-9\_9.
76. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74(12), 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
77. NP-875:1994. *Alimentos para animais; Determinação do teor de humidade*.
78. NP-1421:1977. *Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez*.
79. Swain, T. & Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. *J. Sci. Food Agri.*, **1959**, 10, 63–68. doi: 10.1002/jsfa.2740100110.
80. Sousa, C. M. D. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, **2007**, 30(2), 351–355. doi: 10.1590/S0100-40422007000200021.
81. Arnao, M. B., Cano, A. & Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, **2001**, 73, 239–244. doi: S0308-8146(00)00324-1.
82. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb. Wiss.u. Technol.*, **1995**, 28(1), 25–30. doi: 0023-6438/95/010025.
83. Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V. & Aguiar, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, **2010**, 33(10), 2202–2210. doi: 10.1590/S0100-40422010001000033.
84. Ferreira, M. D. & Spricigo, P. C. Colorimetria: Princípios e aplicações na agricultura. In *Instrumentação Pós-colheita em frutas e hortaliças*, Embrapa Instrumentação, São Carlos, **2017**, pp. 209–220.
85. Mouw, T. Tolerancing Part 3: Color Space vs. Color Tolerance. *X-Rite Color Blog* Disponível em: <https://www.xrite.com/blog/tolerancing-part-3> (Acedido a 25 fevereiro 2021).
86. Bolin, H. R. & Huxsoll, C. C. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *J. Food Sci.*, **1991**, 56(2), 416–419. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb05293.x.
87. Allegretti, O., Travan, L. & Cividini, R. Drying techniques to obtain white beech. In *Proceedings of the COST E53 Meeting: Quality control for wood and wood products*, Bled, Slovenia, 21-23 Abril (Ed. Gorišek, Ž.), **2009**, pp. 7–13.
88. Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. & Santos-Buelga, C. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food Chem. Toxicol.*, **2012**, 50(5), 1576–1582. doi: 10.1016/j.fct.2012.02.004.
89. ISO 13299:2016. *Sensory analysis — Methodology — General guidance for establishing a sensory profile*.

## Referências Bibliográficas

90. Lim, J. Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Qual. Prefer.*, **2011**, *22*, 733–747. doi: 10.1016/j.foodqual.2011.05.008.
91. StatSoft, Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 8.0. **2007**.
92. Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M. & Silva, C. L. M. Kinetics of changes in the physical quality parameters of fresh tomato fruits (*Solanum lycopersicum*, cv. 'Zinac') during storage. *J. Food Eng.*, **2013**, *114*, 338–345. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.024.
93. Pataro, G., Sinik, M., Capitoli, M. M., Donsì, G. & Ferrari, G. The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2015**. doi: 10.1016/j.ifset.2015.06.003.
94. Ferreira, S. M. R. *et al.* Qualidade pós-colheita do tomate de mesa convencional e orgânico. *Ciência e Tecnol. Aliment.*, **2010**, *30(4)*, 858–869. doi: 10.1590/s0101-20612010000400004.
95. Duma, M., Alsina, I., Dubova, L. & Erdberga, I. Chemical composition of tomatoes depending on the stage of ripening. *Chem. Technol.*, **2015**, *66(1)*, 24–28. doi: 10.5755/j01.ct.66.1.12053.
96. Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M. & Silva, C. L. M. Effect of postharvest treatment (hot water and thermosonication) on tomatoes (*Lycopersicum esculentum* L.) physical - chemical and nutritional quality during storage. In *EFFOST - New Challenges in Food Preservation: Pricessing, Safety, Sustainability*, Budapeste, Hungria, 11-13 Novembro, **2009**.
97. Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X. & Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50(25)*, 7449–7454. doi: 10.1021/jf0207530.
98. Augusto, T. R. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtila (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Sci. Technol.*, **2014**, *34(4)*, 667–673 (2014). doi: 10.1590/1678-457X.6393.
99. Parikh, B. & Patel, V. H. Total phenolic content and total antioxidant capacity of common Indian pulses and split pulses. *J. Food Sci. Technol.*, **2018**, *55(4)*, 1499–1507. doi: 10.1007/s13197-018-3066-5.
100. Li, Z. *et al.* Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules*, **2018**, *23*, 1–16. doi: 10.3390/molecules23051139.
101. Camargo, T. M. *et al.* Potencial Antioxidante correlacionado a fenóis totais e antocianinas de cultivares de pequenas frutas. In *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa*, Congrega, **2017**.
102. Arnous, A., Makris, D. P. & Kefalas, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49(12)*, 5736–5742. doi: 10.1021/jf010827s.
103. Imeh, U. & Khokhar, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50(22)*, 6301–6306. doi: 10.1021/jf020342j.
104. Henríquez, C. *et al.* Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chil. J. Agric. Res.*, **2010**, *70(4)*, 523–536. doi: 10.4067/s0718-58392010000400001.
105. Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S. & Patil, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 391–396. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.001.
106. Proteggente, A. R. *et al.* The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic. Res.*, **2002**, *36(2)*, 217–233. doi: 10.1080/10715760290006484.

## Referências Bibliográficas

107. Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E. & Khanizadeh, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(12), 4989–4995. doi: 10.1021/jf048289h.
108. Eberhardt, M. V., Liu, R. H., Smith, N. L. & Lee, C. Y. Antioxidant and anticancer activities of various apple cultivars. *ACS Natl. Meet. B. Abstr.*, **2001**, 221, 37–38. doi: 10.1159/000069277.
109. Fuentes, E. *et al.* Antioxidant and antiplatelet activities in extracts from green and fully ripe tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) and pomace from industrial tomato processing. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, **2013**, 1–9. doi:10.1155/2013/867578.
110. Silva-Beltrán, N. P. *et al.* Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. *Int. J. Anal. Chem.*, **2015** 1–10. doi:10.1155/2015/284071.
111. Spencer, J. P. E. *et al.* The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. *Free Radic. Res.*, **2005**, 39(9), 1005–1016. doi: 10.1080/10715760400022293.
112. Toor, R. K., Lister, C. E. & Savage, G. P. Antioxidant activities of New Zealand-grown tomatoes. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **2005**, 56(8), 597–605. doi: 10.1080/09637480500490400.
113. Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G. & Chesson, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *J. Sci. Food Agric.*, **2002**, 82, 323–330. doi: 10.1002/jsfa.1035.
114. Slimestad, R., Fossen, T. & Verheul, M. J. The Flavonoids of Tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(7), 2436–2441. doi: 10.1021/jf073434n.
115. Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Medina-Rémon, A., Andrés-Lacueva, C. & Lamuela-Raventós, R. M. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. mass Spectrom.*, **2010**, 24, 2986–2992. doi: 10.1002/rcm.
116. Niggeweg, R., Michael, A. J. & Martin, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22(6), 746–754. doi: 10.1038/nbt966.
117. Bajorun, T., Luximon-ramma, A., Crozier, A. & Aruoma, O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, **2004**, 84, 1553–1561. doi: 10.1002/jsfa.1820.
118. Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, **2010**, 71, 1848–1864. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.08.002.
119. Le Gall, G. *et al.* Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51(9), 2438–2446. doi: 10.1021/jf025995e.
120. Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B. & Nagpal, A. K. Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *J. Food Sci. Technol.*, **2018**, 55(8), 2833–2849. doi: 10.1007/s13197-018-3221-z.
121. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. Lisboa: INSA IP, **2019**. Disponível em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5610>
122. Paramithiotis, S., Kouretas, K. & Drosinos, E. H. Effect of ripening stage on the development of the microbial community during spontaneous fermentation of green tomatoes. *J. Sci. Food Agric.*, **2014**, 94, 1600–1606. doi: 10.1002/jsfa.6464.
123. Bah, A. *et al.* Microbial community dynamic in tomato fruit during spontaneous

## Referências Bibliográficas

- fermentation and biotechnological characterization of indigenous lactic acid bacteria. *Ann. Microbiol.*, **2018**, 69, 41–49. doi: 10.1007/s13213-018-1385-4).
124. Behera, S. S., Ray, R. C. & Zdolec, N. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *Biomed Res. Int.*, **2018**, 1–18. doi: 10.1155/2018/9361614.
  125. Carvalho, E. C. Identificação fenotípica e molecular de bactérias patogênicas associadas à criação de peixes amazônicos, Obtenção do título de Mestre em Genética Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, **2012**.
  126. Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E. & Silva, C. C. G. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.*, **2016**. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014.
  127. Moraes, P. M., Martins Perin, L., Silva Júnior, A. & Nero, L. A. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian J. Microbiol.*, **2013**, 44(1), 109–112. doi: 10.1590/S1517-83822013000100015.
  128. Ahrné, S., Molin, G. & StÅhl, S. Plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from meat and meat products. *Syst. Appl. Microbiol.*, **1989**, 11, 320–325. doi: 10.1016/S0723-2020(89)80031-1.
  129. Mohania, D. *et al.* Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J. Dig. Dis.*, **2008**, 9, 190–198. doi: 10.1111/j.1751-2980.2008.00345.x.
  130. Kandyliis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M. & Koutinas, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2016**, 7, 58–63. doi: 10.1016/j.cofs.2015.11.012.
  131. Angmo, K., Kumari, A., Savitri & Bhalla, T. C. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Sci. Technol.*, **2016**, 66, 428–435. doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.057.
  132. Paula, A. T. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Ann. Microbiol.*, **2014**, 65(2), 899–910. doi: 10.1007/s13213-014-0933-9.
  133. Sathyapriya, A. & Anitha, A. Assessment of probiotic potential *Leuconostoc mesenteroides* from natural microbiota. *Int. J. Sci. Res. Biol. Sci.*, **2019**, 5(6), 26–33. doi: 10.26438/ijrbs/v5i6.2633.
  134. Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P. & Ayyash, M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Sci. Technol.*, **2017**, 79, 316–325. doi: 10.1016/j.lwt.2017.01.041.
  135. Argyri, A. A. *et al.* Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.*, **2013**, 33, 282–291. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005.
  136. Mahasneh, A. M., Hamdan, S. & Mahasneh, S. A. Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from local traditional fermented products. *Jordan J. Biol. Sci.*, **2015**, 8(2), 81–87. doi: 10.12816/0027552.
  137. Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C. & Onal-Darilmaz, D. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J. Food Sci.*, **2010**, 75(9), 568–573. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01855.x.
  138. Veselá, M., Drdák, M., Šimon, P. & Veselý, M. Utilization of *Lactobacillus* sp. for steroid glycoalkaloids degradation by lactic acid fermentation. *Nahrung - Foodood*, **2002**, 46(4), 251–255. doi: 10.1002/1521-3803(20020701)46:4<251::AID-FOOD251>3.0.CO;2-U.
  139. Giner, M. J., Hizarci, Ö., Martí, N., Saura, D. & Valero, M. Novel approaches to reduce brown pigment formation and color changes in thermal pasteurized tomato juice. *Eur. Food Res. Technol.*, **2013**, 236, 507–515. doi: 10.1007/s00217-012-1900-y.

## Referências Bibliográficas

140. Wang, Y. *et al.* Comparison of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of purple sweet potato nectar. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2012**, *16*, 326–334. doi: 10.1016/j.ifset.2012.07.006.
141. Mena, P. *et al.* Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Food Chem.*, **2013**, *141*, 2122–2129. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.118.
142. Kathiravan, T., Kumar, R., Lakshmana, J. H., Kumaraswamy, M. R. & Nadanasabapathi, S. Pulsed electric field processing of functional drink based on tender coconut water (*Cocos nucifera* L.) - nannari (*Hemidesmus indicus*) blended beverage. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, **2014**, *6*(2), 84–96. doi: 10.17508/cjfst.2014.6.2.04.
143. Andrés, V., Villanueva, M. J. & Tenorio, M. D. Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. *LWT - Food Sci. Technol.*, **2015**. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.066.
144. Queirós, R. P. *et al.* High pressure and thermal pasteurization effects on sweet cherry juice microbiological stability and physicochemical properties. *High Press. Res.*, **2015**, *35*(1), 69–77. doi: 10.1080/08957959.2014.990009.
145. Liu, F., Li, R., Wang, Y., Bi, X. & Liao, X. Effects of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time on mango nectars: Changes in microorganisms, acid invertase, 5-hydroxymethylfurfural, sugars, viscosity, and cloud. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2014**, *22*, 22–30. doi: 10.1016/j.ifset.2013.11.014
146. Silvério, S. M. J. *Novos Produtos de Hortofrutícolas Fermentados*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, **2014**.
147. Chen, D. *et al.* Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2013**, *19*, 85–94. doi: 10.1016/j.ifset.2013.03.003.
148. Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2008**, *9*, 272–279. doi: 10.1016/j.ifset.2007.07.009.
149. Vitali, B. *et al.* Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.*, **2012**, *31*, 116–125. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.027.
150. Kohadjová, Z., Karovicová, J. & Greifová, M. Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *J. Food Nutr. Res.*, **2006**, *45*(3), 115–119. doi: 10.1556/AAlim.34.2005.3.5.
151. El-Sayed, A. A., Rabie, M. A., Abu El-Maaty, S. M. & El-Nemr, S. E. A. Fermented tomato juice (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) produced via lactic acid bacteria during cold storage. *Carpathian J. Food Sci. Technol.*, **2018**, *10*(1), 5–18. doi: 10.13140/rg.2.2.28590.41287.
152. Ray, R. C. & Joshi, V. K. *Fermented Foods: Past, Present and Future*. In *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*, 1<sup>a</sup> ed., CRC Press Bota Raton, **2015**, pp. 1–36. doi: 10.13140/2.1.1849.8241
153. Septembre-Malaterre, A., Remize, F. & Poucheret, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res. Int.*, **2017**, 1–14. doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.031..
154. Blana, V. A., Grounta, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E. & Panagou, E. Z. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiol.*, **2014**, *38*, 208–218. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.007.
155. Jafar, N. B., Ghaleb, Z. T. & Fadhil, Z. H. Production of fermented red beet juice using probiotic *lactobacilli* bacteria. *Ann. Trop. Med. Public Heal.*, **2019**, *22*(7), 1–5. doi: 10.36295/ASRO.2019.220712.

## Referências Bibliográficas

156. Amanda, E. & Choo, W. S. Effect of refrigerated storage on the physicochemical characteristics and viability of *Lactobacillus plantarum* in fermented watermelon juice with or without supplementation with inulin or fructooligosaccharide. *J. Food Process. Preserv.*, **2018**, *42(12)*, 1–8. doi: 10.1111/jfpp.13831.
157. Alberto, M. R., Perera, M. F. & Arena, M. E. Lactic acid fermentation of peppers. *Food Nutr. Sci.*, **2013**, *4*, 47–55. doi: 10.4236/fns.2013.411a007.
159. Bartkiene, E., Vidmantienė, D., Juodeikiene, G., Viskelis, P. & Urbonaviciene, D. Lactic acid fermentation of tomato: Effects on cis/trans lycopene isomer ratio,  $\beta$ -carotene mass fraction and formation of L(+)- and D(–)-lactic acid. *Food Technol. Biotechnol.*, **2013**, *51(4)*, 471–478.
160. Bartkiene, E., Juodeikiene, G., Zadeike, D. & Viskelis, P. The use of tomato powder fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus sakei* for the ready-to-cook minced meat product quality improvement. *Food Technol. Biotechnol.*, **2015**, *53(2)*, 163–170. doi: 10.17113/ftb.35.02.15.3582.
161. Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M. & Gobbetti, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.*, **2011**, *28*, 1062–1071. doi: 10.1016/j.fm.2011.02.011.
162. Adebo, O. A. & Medina-Meza, I. G. Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, **2020**, *25(4)*, 1–19. doi: 10.3390/molecules25040927.
163. Koh, J. H., Kim, Y. & Oh, J. H. Chemical characterization of tomato juice fermented with bifidobacteria. *J. Food Sci.*, **2010**, *75(5)*, 428–432. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01632.x.
164. Vatansever, S., Vegi, A., Garden-Robinson, J. & Hall III, C. A. The effect of fermentation on the physicochemical characteristics of dry-salted vegetables. *J. Food Res.*, **2017**, *6(5)*, 32–40. doi: 10.5539/jfr.v6n5p32.
165. Kwaw, E. *et al.* Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chem.*, **2018**, *250*, 148–154. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.009.
166. Todorov, S. D. & Franco, B. D. G. de M. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Rev. Int.*, **2010**, *26*, 205–229. doi: 10.1080/87559129.2010.484113.
167. Khanna, S. Effects of salt concentration on the physicochemical properties and microbial safety of spontaneously fermented cabbage. *Electronic Theses and Dissertations*, vol. 3013, University of Maine, **2019**. Disponível em: <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/3013>.
168. Amin, A. M., Jaafar, Z. & Khim, L. Effect of salt on tempoyak fermentation and sensory evaluation. *J. Biol. Sci.*, **2004**, *4(5)*, 650–653. doi: 10.3923/jbs.2004.650.653.
169. Omafuvbe, B. O. Effect of salt on the fermentation of soybean (*Glycine max*) into daddawa using *Bacillus subtilis* as starter culture. *African J. Biotechnol.*, **2006**, *5(10)*, 1001–1005. doi: 10.4314/ajb.v5i10.42826.
170. Martínez, J. P. *et al.* Effects of salt stress on fruit antioxidant capacity of wild (*Solanum chilense*) and domesticated (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) tomatoes. *Agronomy*, **2020**, *10*, 1–17. doi: 10.3390/agronomy10101481.
171. Pérez-Labrada, F. *et al.* Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. *Plants*, **2019**, *8*, 1–17. doi: 10.3390/plants8060151.
172. Yuan, G., Wang, X., Guo, R. & Wang, Q. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chem.*, **2010**, *121*, 1014–1019. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.040.
173. Guo, L., Yang, R., Wang, Z., Guo, Q. & Gu, Z. Effect of NaCl stress on health-promoting

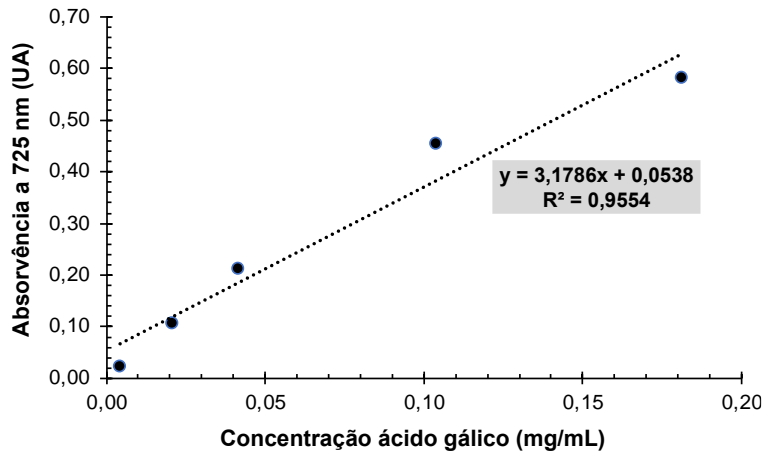
## Referências Bibliográficas

- compounds and antioxidant activity in the sprouts of three broccoli cultivars. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **2014**, 65(4), 476–481. doi: 10.3109/09637486.2013.860583.
174. Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., López-López, A. & Garrido-Fernández, A. Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT - Food Sci. Technol.*, **2011**, 44, 120–129. doi: 10.1016/j.lwt.2010.06.027.
175. Anagnostopoulos, D. A. *et al.* Benefits of the use of lactic acid bacteria starter in green cracked cypriot table olives fermentation. *Foods*, **2020**, 9(17), 1–22. doi: 10.3390/foods9010017.
176. Yang, X. *et al.* Antioxidant properties of a vegetable–fruit beverage fermented with two *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Sci. Biotechnol.*, **2018**, 27(6), 1719–1726. doi: 10.1007/s10068-018-0411-4.
177. Chen, W., Chen, R., Chen, W., Chen, H. & Zhang, G. Comparative evaluation of the antioxidant capacities, organic acids, and volatiles of papaya juices fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Food Qual.*, **2018**, 1–12. doi: 10.1155/2018/9490435.
178. Kachouri, F. *et al.* Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *J. Food Sci. Technol.*, **2015**, 52(12), 7924–7933. doi: 10.1007/s13197-015-1912-2.
179. Panda, S. K. *et al.* Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* - ATCC 9338. *LWT - Food Sci. Technol.*, **2016**, 75, 453–459. doi: 10.1016/j.lwt.2016.09.026.
180. Ricci, A. *et al.* Development of lactic acid-fermented tomato products. *Microorganisms*, **2020**, 8(8), 1–13. doi: 10.3390/microorganisms8081192.
181. Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I. & Kim, G. B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.*, **2014**, 346–356. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.
182. Rodríguez, H. *et al.* Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **2009**, 132, 79–90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025.
183. Chu, S. C. & Chen, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chem.*, **2006**, 98, 502–507. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.080.
184. Pereira, N.; Alegria, C.; Aleixo, C.; Martins, P.; Gonçalves, E.M.; Abreu, M. Selection of Autochthonous LAB Strains of Unripe Green Tomato towards the Production of Highly Nutritious Lacto-Fermented Ingredients. *Foods*, 2021, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122916>.

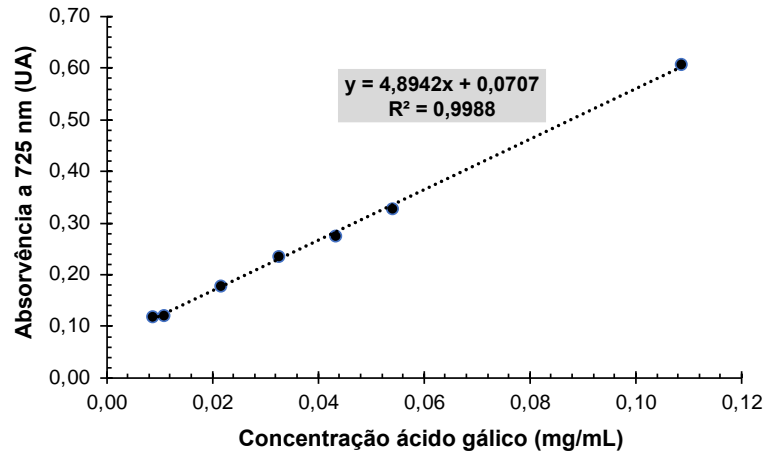


## VI. ANEXOS

## Anexo A – Retas de calibração construídas a partir de ácido gálico

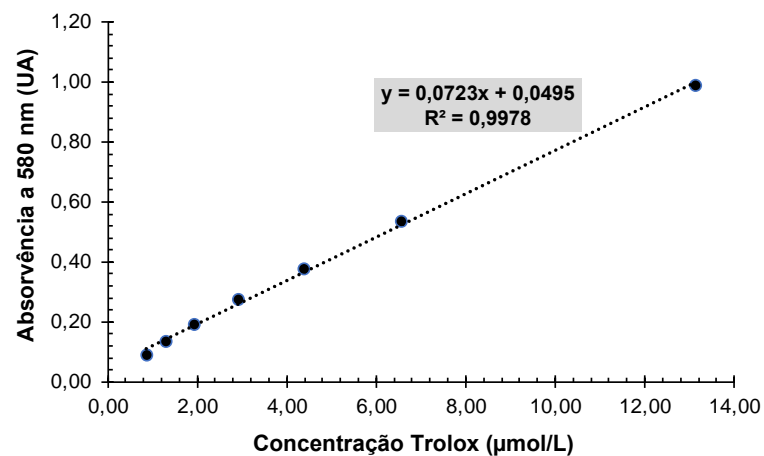


**Figura VI.1** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de ácido gálico na gama 0,004–0,600 mg/mL a  $\lambda = 725$  nm e utilizada para a determinação do CFT durante a caracterização inicial do TV.



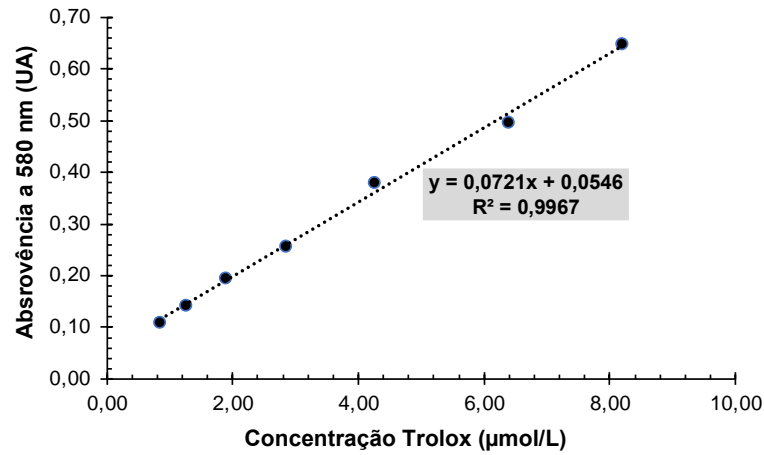
**Figura VI.2** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de ácido gálico na gama 0,004–0,600 mg/mL a  $\lambda = 725$  nm e utilizada para a determinação do CFT durante os ensaios fermentativos.

## Anexo B – Retas de calibração construídas a partir de Trolox

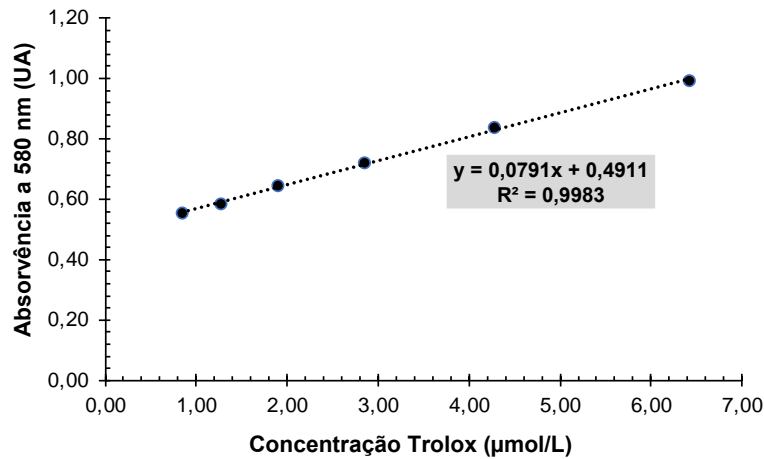


**Figura VI.3** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000  $\mu\text{M}$  a  $\lambda = 580$  nm e utilizada para a determinação da AOX através do método de DPPH durante a caracterização inicial do TV.

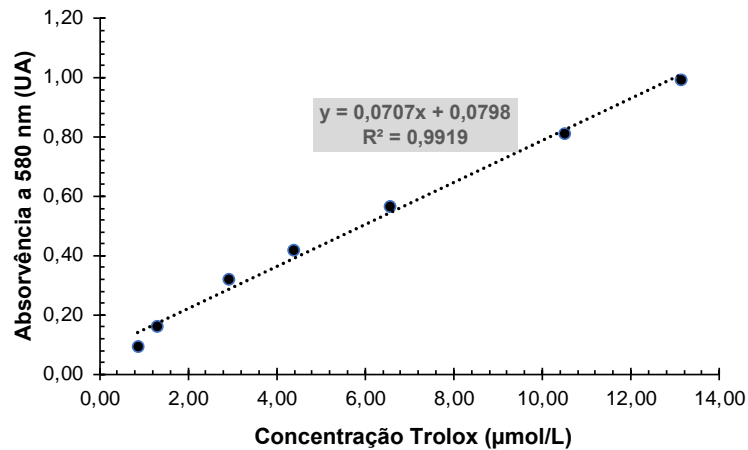
## Anexos



**Figura VI.4** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 µM a  $\lambda = 580$  nm e utilizadas para a determinação da AOX através do método de DPPH durante a realização dos primeiros dois ensaios fermentativos (Ensaio 11.1 e 0).



**Figura VI.5** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 µM a  $\lambda = 580$  nm e utilizadas para a determinação da AOX através do método de DPPH durante a realização do terceiro ensaio fermentativo (Ensaio 11.3).



**Figura VI.6** | Retas de calibração construídas a partir de soluções de Trolox na gama 82–10 000 µM a  $\lambda = 580$  nm e utilizadas para a determinação da AOX através do método de DPPH durante a realização do último ensaio fermentativo (Ensaio 0).

## Anexos

### Anexo C – Exemplo de ficha de prova da análise sensorial

Avaliação sensorial de fermentados de tomate



Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Pretende-se que avalie as três amostras de fermentados de tomate verde codificadas, utilizando a escala a seguir apresentada:

- 9 – Gostei extremamente
- 8 – Gostei muito
- 7 – Gostei moderadamente
- 6 – Gostei ligeiramente
- 5 – Nem gostei, nem desgostei
- 4 – Desgostei ligeiramente
- 3 – Desgostei moderadamente
- 2 – Desgostei muito
- 1 – Desgostei extremamente

Amostra	Aparência	Cor	Aroma	Sabor	Textura (Consistência)	Homogeneidade	Apreciação Global

Qual a amostra que gostou **menos**?

Porquê? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Qual a amostra que gostou **mais**?

Porquê? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Obrigado!

**Figura 14.7** | Ficha de prova utilizada para a avaliação sensorial das amostras fermentadas no ensaio 0.

### Anexo D – Correlação entre os valores de CFT e AOx na caracterização físico-química do TV

**Tabela VI.1** | Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para cada grupo de amostras (verde, intermédio e mistura) durante a caracterização inicial da matéria-prima.

	r (CFT, AOx)	r <sup>2</sup>	p
<b>Todas as amostras</b>	0,85*	0,72	0,004
<b>Verde</b>	1,00*	1,00	0,000
<b>Intermédio</b>	0,89	0,80	0,295
<b>Mistura</b>	1,00*	1,00	0,025

\* indica que houve significância

## Anexos

### Anexo E – Caracterização das estirpes autóctones isoladas

**Tabela VI.2** | Caracterização das estirpes isoladas (observação microscópica e testes da catalase e KOH).

Isolados	Observação microscópica	Teste catalase	Teste KOH
BAL39	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL40	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL41	Bastonetes grossos, muito pequenos, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL42	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL43	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL44	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL45	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL46	Bastonetes finos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL47	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL48	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL49	Bastonetes grossos, pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL50	Bastonetes muito pequenos, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL51	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL52	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL53	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL54	Bastonetes grossos, muito pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL55	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL56	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL57	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL58	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL59	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL60	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL61	Bastonetes finos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL62	Bastonetes, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL63	Bastonetes, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL64	Bastonetes, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL65	Bastonetes, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL66	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL67	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL68	Bastonetes grossos, muito pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL69	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL70	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeias pequenas ou médias	-	-
BAL75	Bastonetes grossos, (muito) pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL76	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL77	Bastonetes grossos, (muito) pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL78	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL79	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL80	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL81	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL82	Bastonetes grossos, muitos pequenos e pequenos, isolados ou em cadeias dupla e tripla	-	-
BAL83	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL84	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL85	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-

## Anexos

Isolados	Observação microscópica	Teste catalase	Teste KOH
BAL86	Bastonetes, pequenos e muito pequenos, isolados ou em cadeias dupla e tripla	-	-
BAL87	Bastonetes, pequenos, médios e grandes, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL88	<i>Lactococcus</i> , isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-
BAL89	Bastonetes grossos e imóveis, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL90	Bastonetes finos e imóveis, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia	-	-
BAL91	Cocobacilos grossos, móveis, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL92	Bastonetes grossos, pequenos e médios, isolados ou em cadeias pequenas e médias	-	-
BAL93	Bastonetes, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL94	Bastonetes, muito pequenos, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL95	Bastonetes finos, pequenos e médios, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL96	Bastonetes, muito pequenos, isolados e/ou em diplo	-	-
BAL97	Bastonetes, muito pequenos, isolados e/ou em diplo, alguns em cadeia pequena	-	-

- Indica um resultado negativo



## Anexos

Isolados	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG							
BAL70	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
BAL75	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	?	+	?	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-						
BAL76	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-					
BAL77	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	?	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-					
BAL78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
BAL79	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
BAL80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
BAL81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
BAL82	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-				
BAL83	-	-	-	?	-	?	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-				
BAL84	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-			
BAL85	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	?	+	?	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-		
BAL86	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BAL87	-	-	-	+	-	+	-	-	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-		
BAL88	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BAL89	-	-	-	-	-	+	-	-	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
BAL90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BAL91	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-		
BAL92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BAL93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BAL94	-	-	-	-	-	?	-	-	-	?	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	?	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BAL95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAL96	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
BAL97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	?	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	

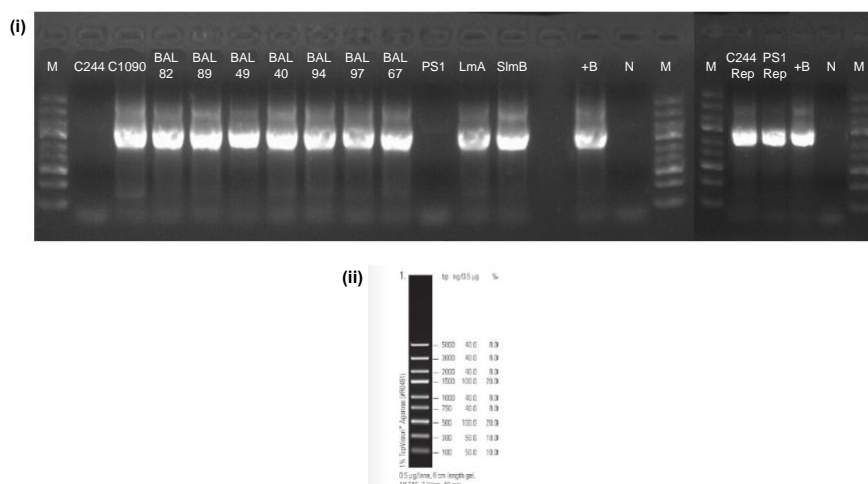
+ Indica um resultado positivo (houve mudança de cor)

- Indica um resultado negativo (não houve mudança de cor)

? Indica um resultado duvidoso, em que a mudança de cor não foi suficientemente clara

GLY: glicerol ; ERY: eritritol ; DARA: D-arabinose ; LARA: L-arabinose ; RIB: ribose ; DXYL: D-xilose ; LXYL: L-xilose ; ADO: adonitol ; MDX: β-metil-D-xilósido ; GAL: galactose ; GLU: D-glucose ; FRU: D-frutose ; MNE: D-manose ; SBE: L-sorbose ; RHA: ramnose ; DUL: dulcitol ; INO: inositol ; MAN: manitol ; SOR: sorbitol ; MDM: α-metil-D-manósido ; MDG: α-metil-D-glucósido ; NAG: N-acetil-glucosamina ; AMY: amígdalina ; ARB: arbutina ; ESC: esculina ; SAL: salicina ; CEL: celobiose ; MAL: maltose ; LAC: lactose ; MEL: melibiose ; SAC: sacarose ; TRE: trealose ; INU: inulina ; MLZ: melezitose ; RAF: D-rafinose ; AMD: amido ; GLYG: glicogénio ; XLT: xilitol ; GEN: β-gentibiose ; TUR: D-turanose ; LYX: D-lixose ; TAG: D-tagatose ; DFUC: D-fucose ; LFUC: L-fucose ; DARL: D-arabitol ; LARL: L-arabitol ; GNT: gluconato ; 2KG: 2-ceto-gluconato ; 5KG: 5-ceto-gluconato

## Anexo F – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR



**Figura VI.8** | (i) Eletroforese em gel de agarose (1,5 %, 120 V, 20 minutos) de 2 µL dos produtos de PCR. M – Marcadores de DNA; +B – Controlo positivo bacteriano; N – controlo negativo. (ii) Marcadores de DNA (5 µL) utilizados na eletroforese.

## Anexo G – Variação das contagens de BAL nas condições controlo das estirpes testadas aquando da avaliação do seu potencial probiótico

**Tabela VI.4** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) das contagens de BAL (log UFC/mL) de todas as estirpes testadas ao fim dos tempos em estudo (t = 0, 3 e 4 h) em meio MRS e em meio TV.

Amostra	Estirpe	Origem	Meio	Contagens (log UFC/mL)		
				0 h	3 h	4 h
C244	<i>L. plantarum</i>	Coleção	MRS	7,9 ± 0,1	8,7 ± 0,2	9,2 ± 0,0
C1090	<i>W. paramesenteroides</i>	Coleção	MRS	7,7 ± 0,1	8,6 ± 0,0	9,1 ± 0,0
BAL40	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	MRS	7,6 ± 0,1	8,5 ± 0,1	9,0 ± 0,3
BAL49	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	MRS	9,7 ± 0,3	9,5 ± 0,0 *	9,5 ± 0,0 *
BAL67	<i>L. lactis</i>	Autóctone	MRS	7,7 ± 0,1	8,9 ± 0,0	7,7 ± 0,0
BAL82	<i>L. Citreum</i>	Autóctone	MRS	9,5 ± 0,2	9,5 ± 0,0 *	9,5 ± 0,0 *
BAL89	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	MRS	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,5 ± 0,1
BAL94	<i>W. confusa</i>	Autóctone	MRS	7,8 ± 0,1	8,7 ± 0,2	8,8 ± 0,0
BAL97	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	MRS	7,3 ± 0,0	8,1 ± 0,1	8,6 ± 0,0
C244	<i>L. plantarum</i>	Coleção	TV	7,8 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,5 ± 0,0
C1090	<i>W. paramesenteroides</i>	Coleção	TV	7,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,4 ± 0,0
BAL40	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	TV	7,5 ± 0,1	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,3
BAL49	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	TV	9,9 ± 0,0	9,5 ± 0,0 *	9,4 ± 0,1
BAL67	<i>L. lactis</i>	Autóctone	TV	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,1	8,9 ± 0,1
BAL82	<i>L. Citreum</i>	Autóctone	TV	9,5 ± 0,0 *	9,5 ± 0,0 *	9,5 ± 0,0 *
BAL89	<i>W. cibaria</i>	Autóctone	TV	7,3 ± 0,1	8,3 ± 0,0	8,4 ± 0,0
BAL94	<i>W. confusa</i>	Autóctone	TV	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,1 ± 0,1
BAL97	<i>L. plantarum</i>	Autóctone	TV	7,4 ± 0,0	7,6 ± 0,0	7,9 ± 0,1

\* Indica as situações em que as colónias foram incontáveis à diluição 10<sup>-7</sup>. Nestes casos, assumiu-se, portanto, um valor superior a 9 log UFC/mL.

## Anexos

### Anexo H – Variação dos valores de pH, AT, TSS, CFT e AOx das amostras testadas no ensaio 11.1

**Tabela VI.5** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH, TSS, CFT e AOx de amostras de polpa de TV fermentadas espontaneamente com (Esp\_CTT) e sem (Esp\_STT) aplicação de TT ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Amostra	Tempo (horas)	AT (g AL/100g PF)	pH	TSS (°Brix)	CFT (mg EAG/100g PF)	AOx ( $\mu\text{mol ET}/100\text{g PF}$ )
Esp_STT	0	0,81 <sup>a</sup> ± 0,02	4,52 <sup>c</sup> ± 0,00	6,20 <sup>b</sup> ± 0,05	47,42 <sup>a</sup> ± 5,77	805,15 <sup>ab</sup> ± 32,28
	24	0,56 <sup>a</sup> ± 0,07	4,31 <sup>bc</sup> ± 0,09	5,87 <sup>ab</sup> ± 0,03	43,17 <sup>a</sup> ± 8,72	659,74 <sup>ab</sup> ± 88,67
	48	0,76 <sup>a</sup> ± 0,09	4,21 <sup>abc</sup> ± 0,06	5,43 <sup>abc</sup> ± 0,51	35,40 <sup>a</sup> ± 1,29	466,12 <sup>a</sup> ± 32,43
	72	1,07 <sup>ab</sup> ± 0,16	3,88 <sup>ade</sup> ± 0,02	5,43 <sup>abc</sup> ± 0,15	34,40 <sup>a</sup> ± 2,54	482,73 <sup>a</sup> ± 28,25
	168	1,90 <sup>c</sup> ± 0,05	3,52 <sup>d</sup> ± 0,02	4,82 <sup>cd</sup> ± 0,26	40,87 <sup>a</sup> ± 3,14	1107,97 <sup>ab</sup> ± 22,66
	336	1,55 <sup>bc</sup> ± 0,34	3,59 <sup>de</sup> ± 0,16	4,08 <sup>d</sup> ± 0,20	42,00 <sup>a</sup> ± 3,13	1229,11 <sup>ab</sup> ± 79,00
Esp_CTT	0	0,83 <sup>a</sup> ± 0,03	4,20 <sup>abc</sup> ± 0,01	5,62 <sup>abc</sup> ± 0,20	35,76 <sup>a</sup> ± 2,45	784,96 <sup>ab</sup> ± 26,63
	24	0,77 <sup>a</sup> ± 0,06	4,10 <sup>ab</sup> ± 0,04	6,12 <sup>ab</sup> ± 0,15	42,30 <sup>a</sup> ± 3,93	603,43 <sup>a</sup> ± 124,68
	48	0,75 <sup>a</sup> ± 0,03	4,20 <sup>abc</sup> ± 0,12	5,82 <sup>ab</sup> ± 0,08	41,74 <sup>a</sup> ± 2,98	727,43 <sup>ab</sup> ± 108,45
	72	0,85 <sup>a</sup> ± 0,19	4,06 <sup>abf</sup> ± 0,06	5,47 <sup>abc</sup> ± 0,28	38,85 <sup>a</sup> ± 10,80	735,88 <sup>ab</sup> ± 104,36
	168	1,15 <sup>ab</sup> ± 0,32	3,93 <sup>aef</sup> ± 0,26	5,48 <sup>abc</sup> ± 0,39	63,69 <sup>a</sup> ± 27,88	1234,14 <sup>ab</sup> ± 510,58
	336	1,94 <sup>c</sup> ± 0,56	3,68 <sup>def</sup> ± 0,28	5,18 <sup>bc</sup> ± 0,73	66,06 <sup>a</sup> ± 40,15	1420,59 <sup>b</sup> ± 735,97

### Anexo I – Variação dos valores de pH, AT, TSS e CFT das amostras testadas no ensaio 11.2 e correlações dos parâmetros colorimétricos

**Tabela VI.6** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH e TSS de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente) ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Amostra	Tempo (horas)	AT (g AL/100g PF)	pH	TSS (°Brix)
Esp_STT	0	0,60 <sup>abcd</sup> ± 0,03	4,29 <sup>efgi</sup> ± 0,05	6,34 <sup>g</sup> ± 0,05
	24	0,52 <sup>ab</sup> ± 0,08	4,35 <sup>gi</sup> ± 0,07	6,38 <sup>g</sup> ± 0,29
	48	0,57 <sup>abcd</sup> ± 0,02	4,21 <sup>defghi</sup> ± 0,07	5,57 <sup>def</sup> ± 0,17
	72	0,79 <sup>cdefghijk</sup> ± 0,06	3,95 <sup>abcdeh</sup> ± 0,12	3,91 <sup>ab</sup> ± 0,54
	168	0,80 <sup>defghijkl</sup> ± 0,19	3,97 <sup>abcdeh</sup> ± 0,24	3,33 <sup>ab</sup> ± 0,24
	336	0,70 <sup>bcdefgh</sup> ± 0,22	4,16 <sup>cdefghi</sup> ± 0,26	3,22 <sup>a</sup> ± 0,44
Esp_CTT	0	0,57 <sup>abcd</sup> ± 0,03	4,31 <sup>fgi</sup> ± 0,05	6,24 <sup>fg</sup> ± 0,11
	24	0,44 <sup>a</sup> ± 0,08	4,42 <sup>i</sup> ± 0,08	6,06 <sup>efg</sup> ± 0,28
	48	0,58 <sup>abcd</sup> ± 0,02	4,17 <sup>cdefghi</sup> ± 0,08	5,01 <sup>cd</sup> ± 0,93
	72	0,68 <sup>abcdeh</sup> ± 0,02	4,02 <sup>bcdefgh</sup> ± 0,11	3,70 <sup>ab</sup> ± 0,76
	168	0,87 <sup>efghijklm</sup> ± 0,26	3,90 <sup>abcdh</sup> ± 0,27	3,33 <sup>ab</sup> ± 0,36
	336	0,71 <sup>bcdefghi</sup> ± 0,32	4,29 <sup>efgi</sup> ± 0,51	3,27 <sup>a</sup> ± 0,45
C244	0	0,54 <sup>abcde</sup> ± 0,02	4,41 <sup>fgi</sup> ± 0,02	6,13 <sup>efg</sup> ± 0,06
	24	0,85 <sup>bcdefghijklm</sup> ± 0,02	3,85 <sup>abcdeh</sup> ± 0,04	5,83 <sup>defg</sup> ± 0,15
	48	1,15 <sup>lm</sup> ± 0,04	3,57 <sup>ab</sup> ± 0,03	4,10 <sup>abc</sup> ± 0,60
	72	1,16 <sup>lm</sup> ± 0,05	3,63 <sup>ab</sup> ± 0,04	3,27 <sup>ab</sup> ± 0,06
	168	1,20 <sup>m</sup> ± 0,13	3,64 <sup>ab</sup> ± 0,03	3,47 <sup>ab</sup> ± 0,12
	336	0,97 <sup>fghijklm</sup> ± 0,06	3,86 <sup>abcdeh</sup> ± 0,04	3,37 <sup>ab</sup> ± 0,21
C202	0	0,55 <sup>abcdef</sup> ± 0,02	4,32 <sup>defghi</sup> ± 0,05	6,03 <sup>efg</sup> ± 0,12
	24	0,84 <sup>bcdefghijklm</sup> ± 0,01	3,79 <sup>abcdh</sup> ± 0,09	5,63 <sup>defg</sup> ± 0,06
	48	1,07 <sup>klm</sup> ± 0,04	3,55 <sup>ab</sup> ± 0,02	3,33 <sup>ab</sup> ± 0,06

## Anexos

Amostra	Tempo (horas)	AT (g AL/100g PF)	pH	TSS (°Brix)
C202	72	1,07 <sup>ijklm</sup> ± 0,01	3,52 <sup>a</sup> ± 0,02	3,47 <sup>ab</sup> ± 0,06
	168	0,69 <sup>abcdefgijkl</sup> ± 0,03	3,98 <sup>abcdefg</sup> ± 0,04	3,20 <sup>ab</sup> ± 0,20
	336	0,66 <sup>abcdefg</sup> ± 0,44	4,04 <sup>abcdefg</sup> ± 0,79	2,93 <sup>a</sup> ± 0,81
C170	0	0,54 <sup>abcdef</sup> ± 0,01	4,32 <sup>defghi</sup> ± 0,03	6,13 <sup>efg</sup> ± 0,06
	24	0,80 <sup>bcdefghijkl</sup> ± 0,01	3,75 <sup>abcd</sup> ± 0,04	5,67 <sup>defg</sup> ± 0,06
	48	1,04 <sup>hijklm</sup> ± 0,03	3,57 <sup>ab</sup> ± 0,04	3,37 <sup>ab</sup> ± 0,06
	72	1,02 <sup>lm</sup> ± 0,03	3,54 <sup>ab</sup> ± 0,01	3,43 <sup>ab</sup> ± 0,06
	168	0,97 <sup>efghijklm</sup> ± 0,06	3,80 <sup>abcdeh</sup> ± 0,08	3,53 <sup>ab</sup> ± 0,25
	336	0,91 <sup>defghijklm</sup> ± 0,17	3,69 <sup>abc</sup> ± 0,14	3,30 <sup>ab</sup> ± 0,36
C1170	0	0,56 <sup>abcdefg</sup> ± 0,02	4,36 <sup>efghi</sup> ± 0,02	5,83 <sup>defg</sup> ± 0,06
	24	0,71 <sup>abcdefg</sup> ± 0,09	3,92 <sup>abcdefg</sup> ± 0,02	5,70 <sup>defg</sup> ± 0,10
	48	1,03 <sup>hijklm</sup> ± 0,05	3,61 <sup>ab</sup> ± 0,02	5,07 <sup>cde</sup> ± 0,25
	72	1,16 <sup>lm</sup> ± 0,11	3,59 <sup>ab</sup> ± 0,05	3,37 <sup>ab</sup> ± 0,06
	168	1,10 <sup>klm</sup> ± 0,14	3,63 <sup>ab</sup> ± 0,05	3,73 <sup>ab</sup> ± 0,12
	336	0,95 <sup>efghijklm</sup> ± 0,15	3,78 <sup>abcdh</sup> ± 0,13	3,60 <sup>ab</sup> ± 0,26
C1090	0	0,59 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	4,29 <sup>cdefghi</sup> ± 0,05	6,53 <sup>fg</sup> ± 0,06
	24	0,44 <sup>abc</sup> ± 0,02	4,27 <sup>cdefghi</sup> ± 0,01	5,73 <sup>defg</sup> ± 0,15
	48	0,58 <sup>abcdef</sup> ± 0,02	4,00 <sup>abcdefg</sup> ± 0,02	4,30 <sup>bc</sup> ± 0,00
	72	0,64 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	3,80 <sup>abcdeh</sup> ± 0,03	3,10 <sup>ab</sup> ± 0,00
	168	0,57 <sup>abcdef</sup> ± 0,07	4,07 <sup>abcdefg</sup> ± 0,10	3,00 <sup>a</sup> ± 0,26
	336	0,59 <sup>abcdef</sup> ± 0,12	4,25 <sup>cdefghi</sup> ± 0,21	3,10 <sup>ab</sup> ± 0,10

**Tabela VI.7** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) do CFT de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C244, C202, C170, C1170 e C1090) e de amostras não inoculadas (Esp\_CTT e Esp\_STT, com e sem TT, respetivamente) ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Amostra	Tempo (horas)	CFT (mg EAG/100g PF)
Esp_STT	0	52,53 <sup>c</sup> ± 8,87
	168	43,68 <sup>ab</sup> ± 3,02
	336	42,68 <sup>ab</sup> ± 2,72
Esp_CTT	0	44,82 <sup>b</sup> ± 1,06
	168	44,22 <sup>b</sup> ± 4,35
	336	44,59 <sup>b</sup> ± 2,44
C244	0	43,91 <sup>abc</sup> ± 0,19
	168	38,41 <sup>ab</sup> ± 0,79
	336	34,86 <sup>a</sup> ± 2,43
C202	0	46,86 <sup>bc</sup> ± 3,21
	168	47,10 <sup>bc</sup> ± 4,86
	336	39,37 <sup>ab</sup> ± 4,46
C170	0	45,91 <sup>abc</sup> ± 1,19
	168	44,76 <sup>abc</sup> ± 0,28
	336	40,64 <sup>ab</sup> ± 0,93
C1170	0	43,91 <sup>abc</sup> ± 0,19
	168	41,94 <sup>ab</sup> ± 0,55
	336	40,93 <sup>ab</sup> ± 1,06
C1090	0	44,45 <sup>abc</sup> ± 0,09
	168	43,14 <sup>ab</sup> ± 0,76
	336	43,04 <sup>ab</sup> ± 0,96

## Anexos

**Tabela VI.8** | Correlações entre os parâmetros colorimétricos (a\*, °h, WI e DTC) e os parâmetros pH e AT para todas as amostras (Esp\_STT, Esp\_CTT, C244, C202, C170, C1170 e C1090).

	a*	°h	WI	DTC	pH	AT
a*	1,00 (p = --)	-0,99* (p = 0,00)	0,06 (p = 0,41)	0,63* (p = 0,00)	-0,21* (p = 0,00)	0,14* (p = 0,04)
°h		1,00 (p = --)	-0,03 (p = 0,70)	-0,63* (p = 0,00)	0,18* (p = 0,01)	-0,12 (p = 0,10)
WI			1,00 (p = --)	0,65* (p = 0,00)	-0,42* (p = 0,00)	0,45* (p = 0,00)
DTC				1,00 (p = --)	-0,29* (p = 0,00)	0,29* (p = 0,00)
pH					1,00 (p = --)	-0,88* (p = 0,00)
AT						1,00 (p = --)

\* indica que houve significância.

## Anexo J – Variação dos valores de pH, AT, TSS, CFT e AOx das amostras testadas no ensaio 11.3

**Tabela VI.9** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH e TSS de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S) ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

Amostra	Adição NaCl	Tempo (horas)	AT (g AL/100 g PF)	pH	TSS (°Brix)
Esp	Sem NaCl	0	0,90 <sup>abcd</sup> ± 0,02	3,90 <sup>ijkl</sup> ± 0,01	5,78 <sup>defg</sup> ± 0,03
		24	0,89 <sup>abcd</sup> ± 0,27	3,96 <sup>klm</sup> ± 0,10	5,77 <sup>defg</sup> ± 0,08
		48	0,77 <sup>a</sup> ± 0,05	4,11 <sup>lm</sup> ± 0,08	4,23 <sup>abc</sup> ± 0,75
		72	0,83 <sup>ab</sup> ± 0,07	4,03 <sup>lm</sup> ± 0,04	3,53 <sup>a</sup> ± 0,97
		168	0,83 <sup>ab</sup> ± 0,10	3,86 <sup>hijkl</sup> ± 0,19	3,40 <sup>a</sup> ± 0,69
		336	0,93 <sup>abcde</sup> ± 0,56	4,25 <sup>m</sup> ± 0,45	3,53 <sup>a</sup> ± 0,49
Esp	Com NaCl	0	0,95 <sup>abcdef</sup> ± 0,03	3,61 <sup>fghij</sup> ± 0,03	8,88 <sup>i</sup> ± 0,55
		24	1,07 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	3,62 <sup>fghij</sup> ± 0,03	8,88 <sup>i</sup> ± 0,55
		48	1,02 <sup>abcdefg</sup> ± 0,04	3,50 <sup>bcdefg</sup> ± 0,01	6,78 <sup>gh</sup> ± 0,62
		72	0,95 <sup>abcdef</sup> ± 0,04	3,58 <sup>defghi</sup> ± 0,02	6,33 <sup>efg</sup> ± 0,38
		168	0,87 <sup>abc</sup> ± 0,02	3,70 <sup>ghijk</sup> ± 0,06	6,35 <sup>efg</sup> ± 0,55
		336	0,67 <sup>a</sup> ± 0,26	4,12 <sup>lm</sup> ± 0,31	6,28 <sup>defg</sup> ± 0,68
C244	Sem NaCl	0	0,89 <sup>abcd</sup> ± 0,02	3,92 <sup>kl</sup> ± 0,01	5,60 <sup>defg</sup> ± 0,05
		24	1,23 <sup>bcdefghij</sup> ± 0,02	3,56 <sup>bcdefgh</sup> ± 0,01	5,22 <sup>cde</sup> ± 0,03
		48	1,58 <sup>j</sup> ± 0,00	3,33 <sup>abcdef</sup> ± 0,00	3,92 <sup>ab</sup> ± 0,28
		72	1,59 <sup>j</sup> ± 0,10	3,39 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	3,53 <sup>a</sup> ± 0,20
		168	1,39 <sup>ghij</sup> ± 0,05	3,40 <sup>abcdefg</sup> ± 0,02	3,28 <sup>a</sup> ± 0,13
		336	1,48 <sup>ij</sup> ± 0,05	3,48 <sup>abcdefg</sup> ± 0,02	3,42 <sup>a</sup> ± 0,19
C244	Com NaCl	0	0,92 <sup>abcd</sup> ± 0,03	3,60 <sup>efghij</sup> ± 0,00	8,05 <sup>i</sup> ± 0,05
		24	0,98 <sup>a</sup> ± 0,02	3,43 <sup>abcdefg</sup> ± 0,03	7,75 <sup>hi</sup> ± 0,05
		48	1,50 <sup>j</sup> ± 0,13	3,16 <sup>a</sup> ± 0,02	6,47 <sup>fg</sup> ± 0,03
		72	1,24 <sup>cdefghij</sup> ± 0,13	3,24 <sup>abc</sup> ± 0,02	5,98 <sup>defg</sup> ± 0,15
		168	1,36 <sup>fghij</sup> ± 0,07	3,24 <sup>abc</sup> ± 0,01	6,10 <sup>defg</sup> ± 0,13
		336	1,43 <sup>hij</sup> ± 0,03	3,28 <sup>abcde</sup> ± 0,02	6,18 <sup>defg</sup> ± 0,03
C1090	Sem NaCl	0	0,88 <sup>abcd</sup> ± 0,02	3,90 <sup>ijkl</sup> ± 0,00	5,40 <sup>cdef</sup> ± 0,05
		24	1,26 <sup>cdefghij</sup> ± 0,04	3,56 <sup>cdefgh</sup> ± 0,00	5,07 <sup>bcd</sup> ± 0,03
		48	1,58 <sup>j</sup> ± 0,01	3,32 <sup>abcdef</sup> ± 0,03	3,47 <sup>a</sup> ± 0,10
		72	1,42 <sup>hij</sup> ± 0,12	3,41 <sup>abcdefg</sup> ± 0,03	3,37 <sup>a</sup> ± 0,03

## Anexos

Amostra	Adição NaCl	Tempo (horas)	AT (g AL/100 g PF)	pH	TSS (°Brix)
C1090	Sem NaCl	168	1,39 <sup>ghij</sup> ± 0,07	3,41 <sup>abcdefg</sup> ± 0,03	3,35 <sup>a</sup> ± 0,10
		336	1,50 <sup>i</sup> ± 0,04	3,48 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	3,48 <sup>a</sup> ± 0,16
C1090	Com NaCl	0	0,93 <sup>abcde</sup> ± 0,02	3,60 <sup>efghij</sup> ± 0,01	8,53 <sup>i</sup> ± 0,40
		24	1,08 <sup>abcdefghi</sup> ± 0,01	3,43 <sup>abcdefg</sup> ± 0,01	8,30 <sup>i</sup> ± 0,22
		48	1,58 <sup>j</sup> ± 0,01	3,16 <sup>a</sup> ± 0,01	6,27 <sup>defg</sup> ± 0,42
		72	1,34 <sup>efghij</sup> ± 0,01	3,23 <sup>ab</sup> ± 0,01	6,32 <sup>efg</sup> ± 0,29
		168	1,29 <sup>defghij</sup> ± 0,04	3,26 <sup>abcd</sup> ± 0,02	6,27 <sup>defg</sup> ± 0,43
		336	1,37 <sup>ghij</sup> ± 0,08	3,29 <sup>abcdef</sup> ± 0,03	6,43 <sup>efg</sup> ± 0,33

**Tabela VI.10** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) do CFT e AOx de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL sem (C244, C1090) e com (C244\_S, C1090\_S) adição de NaCl e de amostras não inoculadas nas mesmas condições (Esp e Esp\_S) ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Amostra	Adição NaCl	Tempo (horas)	CFT (mg EAG/100g PF)	AOx (µmol ET/100g PF)
Esp	Sem NaCl	0	39,22 <sup>efghi</sup> ± 1,77	1334,16 <sup>ijklmn</sup> ± 44,44
		24	35,39 <sup>abcdefghi</sup> ± 1,63	1122,41 <sup>cdefghi</sup> ± 8,42
		48	37,51 <sup>cdefghi</sup> ± 2,71	1262,04 <sup>ijklm</sup> ± 24,28
		72	34,43 <sup>abcdefghi</sup> ± 2,13	1156,04 <sup>defghi</sup> ± 20,76
		168	34,08 <sup>abcdefghi</sup> ± 2,20	1316,66 <sup>ijklmn</sup> ± 17,27
		336	33,32 <sup>abcdefgh</sup> ± 6,23	1405,01 <sup>mn</sup> ± 83,33
Esp	Com NaCl	0	36,15 <sup>abcdefghi</sup> ± 7,65	1378,39 <sup>lmn</sup> ± 41,01
		24	39,47 <sup>efghi</sup> ± 0,43	1093,34 <sup>cdefg</sup> ± 48,67
		48	36,15 <sup>abcdefghi</sup> ± 3,69	1241,95 <sup>hijkl</sup> ± 19,61
		72	36,69 <sup>bcdefghi</sup> ± 3,76	1156,65 <sup>defghi</sup> ± 11,30
		168	33,89 <sup>abcdefgh</sup> ± 5,38	1339,04 <sup>ijklmn</sup> ± 43,47
		336	39,22 <sup>efghi</sup> ± 2,40	1396,74 <sup>mn</sup> ± 85,21
C244	Sem NaCl	0	41,11 <sup>ghi</sup> ± 0,90	1118,52 <sup>cdefghi</sup> ± 25,06
		24	32,91 <sup>abcdefg</sup> ± 2,36	1014,94 <sup>abcd</sup> ± 66,96
		48	31,29 <sup>abcdef</sup> ± 1,66	930,61 <sup>ab</sup> ± 98,60
		72	31,00 <sup>abcde</sup> ± 1,01	880,70 <sup>a</sup> ± 58,48
		168	28,45 <sup>ab</sup> ± 0,87	1155,56 <sup>defghi</sup> ± 29,17
		336	35,92 <sup>abcdefghi</sup> ± 0,85	1081,97 <sup>cdefg</sup> ± 48,58
C244	Com NaCl	0	42,80 <sup>i</sup> ± 0,73	1334,58 <sup>ijklmn</sup> ± 31,90
		24	42,06 <sup>hi</sup> ± 0,67	1211,35 <sup>efghij</sup> ± 29,31
		48	34,52 <sup>abcdefghi</sup> ± 2,20	1201,12 <sup>efghij</sup> ± 27,92
		72	33,86 <sup>abcdefgh</sup> ± 4,73	1049,43 <sup>bcd</sup> ± 40,73
		168	34,57 <sup>abcdefghi</sup> ± 2,74	1339,14 <sup>ijklmn</sup> ± 52,33
		336	38,95 <sup>efghi</sup> ± 1,05	1201,01 <sup>efghij</sup> ± 25,54
C1090	Sem NaCl	0	32,76 <sup>abcdefg</sup> ± 1,51	1060,07 <sup>bcde</sup> ± 36,36
		24	33,09 <sup>abcdefg</sup> ± 1,59	888,41 <sup>a</sup> ± 68,03
		48	29,06 <sup>abc</sup> ± 0,54	1007,01 <sup>abc</sup> ± 41,37
		72	30,04 <sup>abcd</sup> ± 1,73	1018,54 <sup>abcd</sup> ± 20,96
		168	27,30 <sup>a</sup> ± 1,00	1099,09 <sup>cdefgh</sup> ± 36,13
		336	29,87 <sup>abcd</sup> ± 0,80	1125,88 <sup>cdefghi</sup> ± 38,39
C1090	Com NaCl	0	38,53 <sup>defghi</sup> ± 2,01	1384,27 <sup>lmn</sup> ± 43,06
		24	40,80 <sup>ghi</sup> ± 2,03	1220,58 <sup>ghijk</sup> ± 38,78
		48	33,11 <sup>abcdefg</sup> ± 1,21	1220,95 <sup>ghijk</sup> ± 27,64
		72	34,44 <sup>abcdefghi</sup> ± 0,83	1072,07 <sup>bcdef</sup> ± 12,08
		168	36,02 <sup>abcdefghi</sup> ± 2,96	1360,24 <sup>klmn</sup> ± 39,69
		336	40,03 <sup>fghi</sup> ± 2,61	1414,68 <sup>n</sup> ± 13,77

## Anexos

### Anexo K – Avaliação do TSS de diferentes concentrações de NaCl

**Tabela VI.11** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) do TSS para diferentes concentrações de NaCl em 10 mL de água destilada.

Concentração NaCl (%)	TSS (°Brix)
1	1,2 ± 0,0
1,5	1,8 ± 0,1
2	2,4 ± 0,0
2,5	3,1 ± 0,1
3	3,5 ± 0,1

### Anexo L – Correlação entre os valores de CFT e AOx e entre os parâmetros colorimétricos no ensaio 11.3

**Tabela VI.12** | Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para os grupos de amostras inoculadas (C244, C244\_S, C1090 e C1090\_S) e de amostras controlo (Esp e Esp\_S).

	r (CFT, AOx)	r <sup>2</sup>	p
<b>Todas as amostras</b>	0,51*	0,26	0,002
<b>Amostras inoculadas</b>	0,59*	0,35	0,003
<b>Amostras controlo</b>	-0,15	0,02	0,645

\* indica que houve significância.

**Tabela VI.13** | Correlações entre os parâmetros colorimétricos (a\*, °h, WI e DTC) e os parâmetros pH e AT para todas as amostras (Esp, Esp\_S, C244, C244\_S, C1090 e C1090\_S).

	a*	°h	WI	DTC	pH	AT
<b>a*</b>	1,00 (p = --)	-0,94* (p = 0,00)	-0,07 (p = 0,50)	0,56* (p = 0,00)	0,06 (p = 0,56)	0,20* (p = 0,04)
<b>°h</b>		1,00 (p = --)	-0,09 (p = 0,34)	-0,33* (p = 0,00)	-0,20* (p = 0,04)	-0,06 (p = 0,51)
<b>WI</b>			1,00 (p = --)	-0,40* (p = 0,00)	0,02 (p = 0,85)	0,15 (p = 0,12)
<b>DTC</b>				1,00 (p = --)	-0,24* (p = 0,01)	0,28* (p = 0,00)
<b>pH</b>					1,00 (p = --)	-0,81* (p = 0,00)
<b>AT</b>						1,00 (p = --)

\* indica que houve significância.

## Anexos

### Anexo M – Variação dos valores de pH, AT, TSS, CFT e AOx das amostras testadas no ensaio 11.4 e correlação entre CFT e AOx e entre os parâmetros colorimétricos

**Tabela VI.14** | Valores médios (e respetivo desvio padrão) da AT, pH, TSS, CFT e AOx de amostras de polpa de TV inoculadas com CS puras de BAL (C1090 e BAL97) e de amostras não inoculadas (Esp) ao longo de 14 dias. Para cada coluna, os valores referenciados com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Amostra	Tempo (horas)	AT (g AL/100 g PF)	pH	TSS (°Brix)	CFT (mg EAG/100g PF)	AOx ( $\mu\text{mol ET}/100\text{g PF}$ )
Esp	0	0,83 <sup>ab</sup> ± 0,01	3,95 <sup>h</sup> ± 0,01	9,53 <sup>e</sup> ± 0,15	38,50 <sup>a</sup> ± 2,04	1179,75 <sup>bc</sup> ± 34,60
	24	1,02 <sup>c</sup> ± 0,02	3,92 <sup>gh</sup> ± 0,01	9,52 <sup>e</sup> ± 0,19	37,76 <sup>a</sup> ± 0,96	1168,99 <sup>bc</sup> ± 52,01
	48	0,88 <sup>abc</sup> ± 0,06	3,91 <sup>fgh</sup> ± 0,02	9,52 <sup>e</sup> ± 0,19	38,79 <sup>a</sup> ± 4,14	1156,13 <sup>bc</sup> ± 66,79
	72	0,96 <sup>abc</sup> ± 0,04	3,95 <sup>h</sup> ± 0,02	9,48 <sup>e</sup> ± 0,12	36,66 <sup>a</sup> ± 2,61	1170,21 <sup>bc</sup> ± 111,54
	168	0,98 <sup>abc</sup> ± 0,05	3,85 <sup>de</sup> ± 0,02	9,18 <sup>de</sup> ± 0,12	36,74 <sup>a</sup> ± 2,58	1072,42 <sup>abc</sup> ± 80,36
	336	0,97 <sup>abc</sup> ± 0,06	3,83 <sup>d</sup> ± 0,02	9,13 <sup>de</sup> ± 0,25	38,03 <sup>a</sup> ± 2,75	1215,50 <sup>c</sup> ± 78,05
C1090	0	0,94 <sup>abc</sup> ± 0,03	3,92 <sup>fgh</sup> ± 0,01	8,90 <sup>cd</sup> ± 0,10	34,99 <sup>a</sup> ± 0,84	1095,79 <sup>abc</sup> ± 67,51
	24	0,93 <sup>abc</sup> ± 0,11	3,89 <sup>efg</sup> ± 0,01	8,90 <sup>cd</sup> ± 0,10	35,34 <sup>a</sup> ± 0,82	1107,03 <sup>abc</sup> ± 52,83
	48	0,82 <sup>a</sup> ± 0,02	3,89 <sup>fg</sup> ± 0,01	8,85 <sup>bcd</sup> ± 0,13	36,28 <sup>a</sup> ± 0,54	1118,08 <sup>abc</sup> ± 89,90
	72	0,99 <sup>bc</sup> ± 0,07	3,92 <sup>gh</sup> ± 0,01	8,87 <sup>bcd</sup> ± 0,06	34,43 <sup>a</sup> ± 0,59	1044,39 <sup>abc</sup> ± 25,36
	168	1,70 <sup>e</sup> ± 0,01	3,26 <sup>b</sup> ± 0,01	8,25 <sup>a</sup> ± 0,09	34,53 <sup>a</sup> ± 2,78	1002,50 <sup>ab</sup> ± 69,97
	336	2,19 <sup>g</sup> ± 0,03	3,19 <sup>a</sup> ± 0,00	8,48 <sup>ab</sup> ± 0,18	35,53 <sup>a</sup> ± 2,28	1055,00 <sup>abc</sup> ± 60,39
BAL97	0	0,95 <sup>abc</sup> ± 0,09	3,88 <sup>ef</sup> ± 0,00	8,90 <sup>cd</sup> ± 0,10	37,05 <sup>a</sup> ± 1,05	1177,87 <sup>bc</sup> ± 42,04
	24	1,31 <sup>d</sup> ± 0,09	3,43 <sup>c</sup> ± 0,01	8,48 <sup>ab</sup> ± 0,03	33,74 <sup>a</sup> ± 0,41	958,34 <sup>a</sup> ± 11,54
	48	1,55 <sup>e</sup> ± 0,02	3,29 <sup>b</sup> ± 0,00	8,50 <sup>abc</sup> ± 0,05	35,95 <sup>a</sup> ± 1,51	1070,57 <sup>abc</sup> ± 7,45
	72	2,00 <sup>f</sup> ± 0,03	3,27 <sup>b</sup> ± 0,03	8,30 <sup>a</sup> ± 0,00	36,63 <sup>a</sup> ± 1,06	965,12 <sup>a</sup> ± 71,24
	168	2,18 <sup>g</sup> ± 0,00	3,15 <sup>a</sup> ± 0,01	8,12 <sup>a</sup> ± 0,10	35,99 <sup>a</sup> ± 1,74	1054,42 <sup>abc</sup> ± 37,97
	336	2,19 <sup>g</sup> ± 0,05	3,18 <sup>a</sup> ± 0,00	8,43 <sup>a</sup> ± 0,21	35,48 <sup>a</sup> ± 1,35	962,13 <sup>a</sup> ± 24,77

**Tabela VI.15** | Correlação entre os valores de CFT e AOx para todas as amostras e para os grupos de amostras inoculadas (C1090 e BAL97) e de amostras controlo (Esp).

	r (CFT, AOx)	r <sup>2</sup>	p
<b>Todas as amostras</b>	0,75*	0,56	0,000
<b>Amostras inoculadas</b>	0,51	0,26	0,088
<b>Amostra controlo</b>	0,53	0,28	0,282

\* indica que houve significância

## Anexos

**Tabela VI.16** | Correlações entre os parâmetros colorimétricos ( $a^*$ ,  $^{\circ}h$ , WI e DTC) e os parâmetros pH e AT) para todas as amostras (Esp, C1090 e BAL97).

	$a^*$	$^{\circ}h$	WI	DTC	pH	AT
$a^*$	1,00 (p = --)	-0,92* (p = 0,00)	0,03 (p = 0,82)	-0,13 (p = 0,33)	0,34* (p = 0,01)	-0,35* (p = 0,01)
$^{\circ}h$		1,00 (p = --)	-0,25 (p = 0,07)	0,43* (p = 0,00)	-0,16 (p = 0,25)	0,22 (p = 0,11)
WI			1,00 (p = --)	-0,45* (p = 0,00)	-0,69* (p = 0,00)	0,66* (p = 0,00)
DTC				1,00 (p = --)	0,34* (p = 0,01)	-0,24 (p = 0,08)
pH					1,00 (p = --)	-0,95* (p = 0,00)
AT						1,00 (p = --)

\* indica que houve significância.