

ERIKA MARCELINO CARDOSO

**CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA DETERIORANTE DE
AZEITONA EM SALMOURA ACIDIFICADA**

SÃO CAETANO DO SUL

2012

ERIKA MARCELINO CARDOSO

**CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA DETERIORANTE DE
AZEITONA EM SALMOURA ACIDIFICADA**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia Mauá do
Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia para
a obtenção do título de Mestre em Engenharia de
Processos Químicos e Bioquímicos

Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos
Industriais.

Orientadora: Profa. Dr^a. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

SÃO CAETANO DO SUL

2012

Cardoso, Erika Marcelino

Controle do desenvolvimento de levedura deteriorante de azeitona em salmoura acidificada / Erika Marcelino Cardoso. – São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2012.

64p.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação. Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2012.

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

1. Salmoura 2. Azeitonas 3. Ácidos Orgânicos 4. Leveduras
I. Cardoso, Erika Marcelino. II. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário. III. Título

RESUMO

O presente estudo teve por objetivos isolar e identificar leveduras deteriorantes de azeitonas em conserva comercializadas no Brasil e avaliar a influência da concentração de NaCl, pH e tipo de ácido utilizado na salmoura, no desenvolvimento de uma levedura deteriorante durante o armazenamento da salmoura. A identificação da levedura isolada foi realizada com o auxílio do sistema de identificação API® 20C AUX (bioMérieux®) e pela análise das características macro e micromorfológicas, reprodutivas e fisiológicas. Um planejamento fatorial completo para três fatores, concentrações de sal (4,5% e 5,5%), pH (3,5 e 4,5), tipo de ácido (lático e cítrico) foi realizado de forma a estabelecer eventuais correlações entre esses parâmetros e o crescimento da levedura na salmoura. Os resultados mostraram que a levedura isolada é da espécie *Candida krusei*. O pH, o tipo de ácido e a interação destes fatores foram significativos para o controle do desenvolvimento da levedura na salmoura. A redução no pH de 4,5 para 3,5 reduziu em 1 log a população de levedura na salmoura acidificada com ácido lático armazenada por 7 dias. Na salmoura acidificada com ácido cítrico a redução do pH não influenciou a população de levedura.

PALAVRAS-CHAVE: SALMOURA, AZEITONAS, ÁCIDOS ORGÂNICOS, LEVEDURAS.

ABSTRACT

The aim of the study was to isolate and identify the spoilage yeast of olives brine which is sold in Brazilian market and to evaluate the influence of NaCl concentration, pH and type of acid used in the brine, during the development of a spoilage yeast in the storage brine . The identification of the isolated yeast was performed with the identification system API 20C AUX ® (bioMérieux ®) and the analysis of macro and micromorphological characteristics, reproductive and physiological tests. A full factorial design for three factors, concentrations of salt (4,5% and 5,5%), pH (3,5 and 4,5), type of acid (lactic and citric acid) was performed in order to establish possible correlations between these parameters and the growth of yeast in brine. The results showed that the isolated yeast is the specie *Candida krusei*. The pH, type of acid and the interaction of these factors are significant in the control of yeast development in the brine. The decrease in pH from 4.5 to 3.5 reduced in 1 log the yeast population in the brine acidified with lactic acid stored for 7 days. In brine acidified with citric acid and lowering the pH did not affect the yeast population.

KEYWORDS: BRINE, OLIVES, ORGANIC ACIDS, YEASTS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a paciência, dedicação e conhecimentos de minha orientadora Prof. Dra. Cynthia Kunigk

Ao Prof. Dr. Eriques da Silva e demais colegas do ICB – USP pelo auxílio na identificação das leveduras.

A Prof. Dra. Suzana Ratusznei pelas observações realizadas no exame de qualificação.

Agradeço ao meu marido pela paciência e apoio para confecção deste trabalho.

Aos meus pais, irmãs, demais familiares e amigos que me incentivaram na conclusão deste meu objetivo.

Aos técnicos e funcionários da E. E. M. que colaboraram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	29
FIGURA 2. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁTICAS.....	30
FIGURA 3. IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....	31
FIGURA 4. TESTE DO TUBO GERMINATIVO.....	32
FIGURA 5. MICROCULTIVO EM LÂMINAS.....	33
FIGURA 6. AUXONOGRAMA.....	34
FIGURA 7. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO.....	35
FIGURA 8. ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE NITROGENIO.....	36
FIGURA 9. ZIMOGRAMA.....	36
FIGURA 10. POPULAÇÃO MÉDIA DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) A 4,5% DE NaCl E pH 3,5 DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	49
FIGURA 11. POPULAÇÃO MÉDIA DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) A 5,5% DE NaCl E pH 3,5 DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	49
FIGURA 12. POPULAÇÃO MÉDIA DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) A 5,5% DE NaCl e pH 4,5 DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	50
FIGURA 13. POPULAÇÃO MÉDIA DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) A 4,5% DE NaCl E pH 4,5 DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	50
FIGURA 14. INTERAÇÃO ENTRE O pH E ÁCIDO PARA A POPULAÇÃO DE LEVEDURA NO 7º DIA DE CULTIVO.....	53

FIGURA 15. INTERAÇÃO ENTRE O pH E ÁCIDO PARA A POPULAÇÃO DE LEVEDURA NO 28º DIA DE CULTIVO.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TGY.....	29
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TGY ACIDIFICADO.....	29
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASD.....	32
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO ÁGAR FUBÁ.....	33
TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA ZIMOGRAMA.....	37
TABELA 7 – AÇÚCARES UTILIZADOS NA COMPOSIÇÃO DA SALMOURA.....	37
TABELA 8 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS.....	37
TABELA 9 – ENSAIOS SEGUNDO O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	38
TABELA 10 – CRESCIMENTO DE LEVEDURA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	40
TABELA 11 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS E DIMENSÕES DAS CÉLULAS.....	41
TABELA 12 – LEVEDURAS IDENTIFICADAS.....	42
TABELA 13 - ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO.....	43
TABELA 14 - ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO.....	44
TABELA 15 – FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	45
TABELA 16 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 1.....	47

TABELA 17 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 2.....	47
TABELA 18 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 3.....	48
TABELA 19 – MÉDIA DA POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	48
TABELA 20 – EFEITO DOS FATORES PARA A LEVEDURA DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 ORIGEM E CULTIVO DA AZEITONA.....	12
3.2 CULTIVARES.....	13
3.2.1 Arauco.....	13
3.2.2 Azapa.....	14
3.2.3 Empeltre.....	14
3.2.4 Gordal	14
3.2.5 Manzanilla.....	15
3.2.6 Picual.....	15
3.3 PROCESSAMENTO.....	15
3.4 COMPOSIÇÃO DO FRUTO.....	18
3.4.1 Água.....	18
3.4.2 Substancias graxas.....	18
3.4.3 Açúcares.....	19
3.4.4 Proteínas.....	19
3.4.5 Pectinas.....	19
3.4.6 Ácidos orgânicos.....	20
3.4.7 Polifenóis.....	20
3.4.8 Vitaminas.....	20
3.4.9 Pigmentos.....	21
3.4.10 Compostos inorgânicos.....	21
3.5 DEFEITOS CAUSADOS POR MICROORGANISMOS.....	22
3.5.1 Pontos brancos.....	22
3.5.2 Amolecimento.....	22
3.5.3 Olho de peixe e bolsas de gás.....	23
3.5.4 Fermentação butírica e "zapatera".....	23
3.5.5 Filme de leveduras.....	24
3.6 LEVEDURAS PRESENTES EM SALMOURAS DE AZEITONAS.....	24
3.7 FATORES UTILIZADOS NA CONSERVAÇÃO DE AZEITONAS QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURAS EM AZEITONAS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28

4.1 AMOSTRAS DE SALMOURAS DE AZEITONAS.....	28
4.2 ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS.....	28
4.3 ISOLAMENTO DE BACTERIAS LATICAS.....	30
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....	30
4.4.1 Sistema de identificação API® 20C AUX (BIOMÉRIEUX®).....	30
4.4.2 Método clássico.....	31
4.4.2.1 Tudo germinativo.....	31
4.4.2.2 Microcultivo em lâminas.....	32
4.4.2.3 Auxonograma.....	33
4.4.2.3.1 <i>Assimilação de fontes de carbono.....</i>	<i>34</i>
4.4.2.3.2 <i>Assimilação de fontes de nitrogênio.....</i>	<i>35</i>
4.4.2.4 Zimograma.....	36
4.5 INFLUENCIAS DO TEOR DE SAL, pH E TIPO DE ÁCIDO ORGÂNICO NO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA EM SALMOURA.....	37
4.5.1 Preparo do inóculo de levedura.....	38
4.5.2 Cultivo da levedura em salmoura.....	38
4.5.3 Quantificação da levedura.....	39
4.5.4 Análise estatística.....	39
5 . RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 ISOLAMENTO DE LEVEDURA.....	40
5.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIA LÁTICA.....	40
5.3 CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS E DIMENSÕES DAS LEVEDURAS.....	41
5.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS LEVEDURAS.....	42
5.4.1 Sistema de identificação API® 20C AUX (BIOMÉRIEUX®).....	42
5.4.2 Método clássico.....	42
5.5 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL, pH E TIPO DE ÁCIDO NO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA EM SALMOURA.....	46
6. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Desde os primeiros estudos sobre o processo de fermentação de azeitonas, a presença de diferentes gêneros de leveduras tem sido observada. De modo geral, a população de leveduras aumenta durante a fermentação e atinge a máxima população em torno de 20 dias, quando passa a decrescer (Quintana et al., 2003). As mesmas contribuem de maneira decisiva no sabor característico das azeitonas verdes e ainda são mais decisivas nas azeitonas pretas naturais pois representam a microbiota mais significativa destes produtos (Fernández et al., 1997; Quintana et al., 2005).

Os gêneros *Candida*, *Picchia*, *Torulopsis*, *Kluekera*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, são considerados como os mais representativos no processo fermentativo (Quintana et al., 2005).

Embora as leveduras apresentem um importante papel na fermentação de azeitonas, em muitos casos podem produzir alterações indesejáveis, como amolecimento causado por leveduras de coloração rosada do gênero *Rhodotorula* ou ainda, amolecimento e bolhas, causado por leveduras de metabolismo fermentativo (Vaughn et al., 1972).

As leveduras podem continuar presentes mesmo depois do envase (Quintana et al., 2003). Sua inibição mediante o uso de sorbato de potássio e benzoato de sódio foi estudada (Marsilio y Cichelli, 1992) assim como o emprego de extrato aquoso e óleo essencial ambos obtidos do alho (Asehrou et al., 1997).

A norma qualitativa aplicável a azeitona de mesa no comércio internacional assim como as normas do Codex Alimentarius Commission contemplam o uso dos ácidos sórbicos, ácidos benzóicos e seus sais como conservantes visando estabilizar os produtos finais (Consejo Oleícola Internacional, 2004).

A capacidade dos ácidos lácticos e acéticos em inibir patógenos e leveduras que podem produzir alterações nos alimentos é bem conhecida, entretanto o emprego dos mesmos pode dar lugar a sabores estranhos (Thomas et al., 2002; Narendranath et al. 2001).

Considerando que a estabilização de azeitonas em salmoura sem o uso de conservantes seria interessante, este trabalho tem como objetivo estudar a influência da concentração de NaCl, de ácido láctico ou cítrico, do pH no controle do desenvolvimento de levedura isolada de salmoura de azeitona.

2 OBJETIVOS

1. Isolar e identificar leveduras presentes nas azeitonas em conserva de consumo no Brasil;
2. Estudar a influência do pH, tipo de ácido orgânico e concentração de NaCl no controle do desenvolvimento das leveduras isoladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ORIGEM E CULTIVO DA AZEITONA

Acredita-se que a oliveira seja originária do sul do Cáucaso, das planícies altas do Irã e do litoral mediterrâneo da Síria e da Palestina (Teramoto et al., 2010). Não se sabe sua origem exata, pois sua história coincide com o desenvolvimento das civilizações do mediterrâneo (International Olive Oil Council, 2010).

Entre os séculos 14 e 12 a.C. os fenícios introduziram o cultivo da oliveira no continente grego, cuja regulamentação do plantio ocorreu somente no século 4 a.C. (Bontempo, 2008).

Gregos e fenícios atravessaram o mar Mediterrâneo com as oliveiras entre outros produtos, negociando com países como a Itália, França, Espanha e África (Veiga, 2009).

A disseminação da oliveira pelo mediterrâneo ocidental, feita pelos gregos, atingiu a Península Ibérica e o plantio entrou em área que viria a ser Portugal. Contudo os Romanos também foram grandes agentes do plantio, na sequência da conquista da Península Ibérica no século 2 a.C. e do domínio da província da área que viria a ser Portugal (Teramoto et al., 2010).

A expansão ultramarina nos séculos XV e XVI propiciou um incremento da extensão da área de cultivo em novos mercados como Brasil. Durante o período do Brasil colônia era comum encontrar oliveiras próximas as igrejas e capelas. Quando o país começou a apresentar uma pequena produção a família real ordenou o corte das árvores com medo que o produto da colônia concorresse com o da metrópole portuguesa. Esse fato impediu que a olivicultura se desenvolvesse no Brasil (Teramoto et al., 2010).

Com o aumento das imigrações européias após a 2ª Guerra Mundial, as oliveiras voltaram a ser cultivadas no sul de Minas Gerais pela iniciativa de pequenos produtores da região. Porém por falta de técnicos especializados e motivos políticos parte da cultura deste plantio desapareceu.

Sem produção própria de azeitonas, o Brasil tornou-se dependente da importação e adquiriu entre 2001 e 2005, 11% da produção mundial, para abastecimento do mercado interno (Barranco, 2008).

Atualmente os estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul estão produzindo uma pequena quantidade de azeitonas que não é suficiente para atender a demanda de consumo brasileira.

O cultivo das oliveiras requer uma série de cuidados para que se obtenham resultados satisfatórios na produção. Ventos fortes, frio intenso e correnteza de água do degelo são condições que prejudicam o cultivo. Entretanto, baixas temperaturas são necessárias no período que antecede a floração (final da primavera).

As azeitonas desenvolvem-se durante todo o verão e chegam à maturação verde entre os meses de março e abril na Argentina, Chile e Peru, período em que todos os frutos alcançam uma coloração verde clara.

A maturação completa, redução de açúcares, acúmulo de diversos compostos aromáticos e consequentes mudanças de cor ocorrem no inverno (Fernández et al., 1997).

A coloração das azeitonas depende das espécies e do grau de maturação. No início todas são verdes, mas à medida que vão amadurecendo a coloração vai mudando para tons acastanhados, roxos até atingir a cor preta (esta indica que o fruto encontra-se maduro).

As azeitonas verdes não podem ser consumidas logo após sua colheita, pois são muito amargas. Elas precisam passar por um processamento antes de serem utilizadas ou simplesmente degustadas. Os produtos que se conhecem são azeitonas curtidas em água e NaCl ou em uma solução alcalina.

3.2 CULTIVARES

3.2.1 Arauco

É o principal cultivar na Argentina e é o nome da região da província de La Rioja, no qual se adaptou com mais facilidade após ser importado da Espanha (Balatsouras, 1996).

O fruto é alongado, com a ponta pronunciada e levemente curvada. Seu tamanho varia de 125 a 300 frutos/kg e tem um conteúdo de 22% a 24% de azeite (Fernández et al., 1997).

É utilizada para preparação de azeitonas verdes estilo sevilhano, azeitonas de coloração não uniforme em salmoura e azeitonas pretas temperadas ou ao natural (Balatsouras, 1996).

3.2.2 Azapa

É o cultivar mais popular no Chile para o processamento de azeitona de mesa. Recebeu este nome, pois, refere-se à região próxima a fronteira peruana no qual foi inicialmente plantada. Sua polpa e sua pele são finas. Seu tamanho médio é de 120 frutos/kg (Fernández et al., 1997).

3.2.3 Empeltre

É a variedade mais antiga da Espanha. Seu nome é oriundo do termo catalão *empelt*, que significa enxerto, pois esta variedade foi obtida através de um enxerto sobre uma oliveira mais antiga (Olivae, 2004).

O fruto tem formato alongado e assimétrico, com folhas de formato elíptico e sem curvaturas. É muito apreciado por sua produtividade e pela excelente qualidade de seu azeite (Heredero e Hernandez, 2006).

Possui um conteúdo de azeite em torno de 22% do peso do fruto.

3.2.4 Gordal

Também conhecida como gordal sevilhana, este fruto é cultivado na região da Andaluzia, sobretudo na província de Sevilha, na Espanha.

Seu formato é elipsoidal, com uma incisão na altura do pecíolo, que lembra vagamente a silueta de um coração (Balatsouras, 1996).

Possui tamanho médio de 100 - 120 frutos/kg, uma epiderme fina com pontos brancos, a polpa com uma boa textura e uma coloração verde clara que muda para preto-violáceo quando atinge o estado de maturação completa.

O conteúdo de azeite é muito baixo, geralmente em torno de 10% do peso do fruto. Já o de açúcar é muito alto (4% a 6%), o que facilita a fermentação, momento em que adquire uma cor amarelo a dourado. A acidez da salmoura, sem nenhuma intervenção tecnológica chega a mais de 1% (Balatsouras, 1996).

Este cultivar amadurece cedo, resiste bem ao frio, mas é sensível a seca (Heredero e Hernandez, 2006). É considerado um dos melhores para processamento do fruto ainda verde em salmoura devido à qualidade de sua polpa e excepcional característica sensorial do produto final.

3.2.5 Manzanilla

Algumas vezes também conhecida por Manzanillo, é o cultivar mais plantado não só na Espanha próximo ao rio Guadalquivir e zona sevilhana como também nos demais países do mundo (Fernández et al., 1997).

Possui formato parecido com a de uma maçã, característica que dá nome a variedade. Tem epiderme fina e resistente ao aparecimento de manchas brancas de leveduras, polpa não susceptível a deterioração gasosa e uma ótima textura (Fernández et al., 1997).

Possui um conteúdo de azeite em torno de 15% do peso do fruto e tamanho médio entre 200 a 280 frutos/kg. A quantidade de açúcar é inferior a da Gordal e por esta razão fermenta com maior dificuldade. A acidez chega a 0,8%, sem intervenção externa correspondente a um pH de 4,2 ou mais (Balatsouras, 1996).

Sua coloração é verde clara, pontuada com ligeiras manchas brancas e muda para um tom negro violáceo quando atinge seu grau de maturação (Balatsouras, 1996).

Esta variedade se adapta bem ao frio, tem produtividade elevada e constante. Seus frutos se destinam tanto a produção de azeite quanto de azeitonas de mesa (Heredero e Hernandez, 2006).

3.2.6 Picual

Esta é a variedade de azeitona mais cultivada na Espanha. Tem produtividade elevada e constante. É uma variedade sensível, mas tolerante ao frio (Heredero e Hernandez, 2006).

Seu formato é mais pontudo e o tamanho médio é de 270 - 420 frutos/kg. É muito utilizada para extração de azeite, pois possui um conteúdo de 23 a 27% de seu peso (Fernández et al., 1997).

3.3 PROCESSAMENTO

Deixadas nas oliveiras até atingirem quase seu tamanho ideal, as azeitonas são colhidas manualmente, evitando-se machucar, ferir ou romper os frutos. Então, são transportadas para as indústrias em recipientes com capacidade de 20 kg a 500 kg, constituídos de redes perfuradas, que permitem à aeração dos frutos, evitando danos a polpa (Gómez et al., 2006).

Após esta etapa, seguem para o tratamento em lixívia que consiste em colocar os frutos em tanques de fibra de vidro, com uma solução de hidróxido de sódio de 2,0% a 5% onde permanecem de 3 a 4 horas, para remoção de boa parte da oleuropeína, responsável pelo amargor do fruto ou até se notar que a solução alcalina penetrou na polpa de 2/3 a 3/4 da distância da pele ao caroço (Carmona et al., 2011; Chorianopoulos et al., 2005; Cruess, 1973).

Esta verificação é feita por intermédio da fenolftaleína em solução de 1% de álcool. Corta-se a polpa da azeitona por uma volta completa no sentido do comprimento, deixa-se cair uma gota de solução de fenolftaleína. A parte da polpa atacada pela lixívia fica com a cor rósea (Cruess, 1973).

Para que a penetração da lixívia seja homogênea é recomendável que as azeitonas dentro dos tanques tenham grau de maturação e tamanhos similares (Gómez et al., 2006).

A lixívia é removida submetendo-se as azeitonas a uma lavagem continua, mudando a água dos tanques de 1 a 2 vezes por dia. O término se dá quando não há mais álcali na água empregada. Isso é observado pingando-se fenolftaleína na água de lavagem. Se a alta alcalinidade não for retirada corretamente, favorecerá o desenvolvimento de bactérias deteriorantes (Luh e Woodroof, 1988; Chorianopoulos et al., 2005).

Os frutos lavados são acondicionados inicialmente em uma salmoura a 3%, onde permanecem durante 7 a 10 dias. Após esse período aumenta-se a concentração da salmoura entre 5% e 7% onde permanecem durante 7 a 10 dias. Por fim essa salmoura passa a 8% e 10%. O aumento progressivo das concentrações visa evitar o enrugamento dos frutos (Peixoto, 1951; Gómez et al., 2006).

Inicia-se então a fermentação, que é favorecida pelo aumento de temperatura resultante da exposição ao sol. Os locais de fermentação reúnem condições que não permitem uma redução muito sensível da temperatura durante a noite. Para evitar qualquer tipo de fermentação que possa ocasionar uma deterioração do produto, os tanques de fermentação devem ser mantidos completamente cheios. Isso é feito com a adição de salmoura nova (Peixoto, 1951).

Durante o processo de fermentação, ocorre uma redução na concentração de NaCl na salmoura e um aumento da acidez devido à produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas que consomem os açúcares das salmouras de azeitonas. A espécie *Lactobacillus plantarum* é predominante no processo fermentativo (Chorianopoulos et al., 2005).

Além de bactéria láctica, as espécies de leveduras *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membrana-efaciens* e *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas no processo de fermentação das azeitonas (Hurtado et al., 2008).

O processo de fermentação completo varia de 3 a 4 semanas, mas pode levar mais de um ano, dependendo dos fatores intrínsecos pH, atividade de água, difusão de nutrientes da polpa, e dos extrínsecos temperatura, disponibilidade de oxigênio, concentração de NaCl e do número de bactérias lácticas presentes (Luh e Woodroof, 1988; Hurtado et al., 2008).

Após o término da fermentação, quando as azeitonas apresentam aroma, cor e sabor característicos, os frutos são lavados para extrair todo o sedimento aderido a eles (Peixoto, 1951).

Para se adaptar as diferentes formas de apresentação comercial, as azeitonas fermentadas passam por esteiras transportadoras para remoção dos frutos defeituosos e por uma série de cabos divergentes em série, para determinação do tamanho. A azeitona cai quando a distancia entre os cabos é igual ao seu diâmetro transversal (Gómez et al., 2006).

Atualmente a maioria das fábricas utiliza seletoras eletrônicas para remoção das azeitonas com defeitos (Díaz et al., 2004).

Os frutos classificados são colocados em barricas plásticas de até 300 kg, onde recebem nova salmoura de concentração de 7% a 12% e são mantidos até serem reembalados.

No envase em vidros, colocam-se as azeitonas classificadas nas embalagens que são preenchidas com água e esvaziadas para que fiquem sem sedimentos aderentes. Em seguida, os frascos recebem salmoura a uma temperatura entre 79 a 82°C (Luh e Woodroof, 1988). A concentração da salmoura pode variar entre 4,5% a 6,0%. Segundo Cruess (1973), alguns embaladores acidificam a salmoura com 0,2% a 0,5% de ácido láctico. No Brasil é comum os embaladores acidificarem a salmoura com até 0,1% de ácido cítrico.

Os frascos são fechados e pasteurizados. Esse processo dura cerca de 50 minutos e consiste em um tratamento térmico, no qual o produto é aquecido a 100°C, pré-resfriado entre 40°C e 50°C e resfriado entre 20°C e 25°C (Souza, 2003).

3.4 COMPOSIÇÃO DO FRUTO

3.4.1 Água

É o principal componente da azeitona de mesa. Representa nos frutos em conserva uma média de 76,3% do peso do fruto verde e 68,5% do peso do fruto maduro (Lima et al., 2006).

Essa porcentagem pode diminuir em função do grau de maturação do fruto e do tratamento utilizado para elaboração das azeitonas de mesa.

A quantidade de água presente é responsável pela forma regular das azeitonas, devido à membrana citoplasmática ter uma permeabilidade seletiva e prevenir a desidratação e enrugamento (Balatsouras, 1996).

Durante o tratamento com soda, NaCl e as condições de anaerobiose, a permeabilidade seletiva se perde, fazendo com que a polpa retenha o líquido do fruto em forma de uma sutil membrana em torno das partículas coloidais (Balatsouras, 1996).

As partículas coloidais são compostas essencialmente por proteínas, assim, quanto menor o grau de desnaturação maior será a quantidade de líquido retida pela polpa e consequentemente melhor será o tamanho e a aparência do fruto tratado. A desnaturação das proteínas coloidais por uma geada, devido ao NaCl e a soda terá como resultado uma azeitona enrugada e não apta para o consumo de mesa (Balatsouras, 1996).

3.4.2 Substâncias Graxas

O processamento utilizado para elaboração das azeitonas de mesa não influencia significativamente no teor de lipídios devido a sua insolubilidade em água e tampouco influencia no perfil de ácidos graxos, dada à resistência a oxidação dos ácidos graxos monoinsaturados (Malheiro, 2010).

Dentre os ácidos graxos presentes nas azeitonas, os ácidos oleico, palmítico e linoleico são os que se apresentam em maiores quantidades (Oliveira et al., 2010).

Nos frutos verdes em conserva a quantidade de substâncias graxas chega a uma média a 14,2% e nos frutos maduros em conserva a 20,3% (Lima et al., 2006).

3.4.3 Açúcares

A quantidade de açúcares nos frutos varia entre 10% a 20%. Essa oscilação é decorrente da variedade da azeitona, clima, solo, cultivo, estado de maturação do fruto, entre outros (Oliveira et al., 2010).

Os açúcares fermentescíveis são utilizados como substratos pelas bactérias lácticas e leveduras. Seu elevado conteúdo no fruto facilita a fermentação e melhora a qualidade organoléptica do produto final. Bolores, bactérias aeróbias e leveduras oxidativas não se multiplicam devido às condições de processo.

A fermentação por bactérias lácticas se produz de duas formas: homolática, praticamente todos os açúcares do fruto se convertem a ácido láctico por bactérias homofermentativas e heterolática, onde ocorre a produção de ácido láctico, dióxido de carbono e ácido acético ou etanol dependendo do pH das azeitonas (Ünal e Nergiz, 2003; Balatsouras, 1996).

3.4.4 Proteínas

Parte das proteínas do mesocarpo das azeitonas é solúvel em água e o restante insolúvel. Ünal e Nergiz (2003) encontraram ao redor de 1,3% de proteína na polpa de azeitona que contém aminoácidos indispensáveis à alimentação humana e também necessários para o crescimento das bactérias lácticas.

A parte hidrossolúvel das proteínas, assim como as outras substâncias hidrossolúveis são parcialmente dissolvidas na salmoura sendo substratos para o crescimento das desejadas bactérias lácticas e também dos microrganismos não desejáveis (Balatsouras, 1996).

3.4.5 Pectinas

São constituintes do material de composição intercelular e se encontram em todos os tecidos vegetais.

A hidrólise da pectina por meios físico-químicos (meio alcalino, aumento de temperatura), por enzimas exógenas (microrganismos desenvolvidos em salmoura) ou por causas endógenas na polpa durante a fase de maturação conduz a uma perda da tonicidade do tecido que torna o produto inutilizável.

Considera-se que o conteúdo de pectina do mesocarpo seja de 1,86% a 2,32%. As enzimas pectinolíticas responsáveis pela desnaturação da pectina das azeitonas são as poligalacturonases e as pectinesterases (Balatsouras, 1996).

3.4.6 Ácidos orgânicos

Na polpa da azeitona estão presentes os ácidos orgânicos: cítrico, succínico, galacturônico, láctico, málico e tartárico, cuja quantidade total oscila entre 3280 mg a 7088 mg por quilo, segundo a variedade de azeitona e seu estado de maturação (Arslan, 2012).

A pasta de azeitona resultante da homogeneização do epicarpo e mesocarpo é ligeiramente ácida, com um pH entre 5,0 a 5,6 (Tanilgan et al., 2007).

Para as azeitonas em salmoura, os ácidos orgânicos criam desde o início um meio ácido na salmoura com o qual se previne qualquer desvio do processo normal de fermentação (Balatsouras, 1996).

3.4.7 Polifenóis

Os polifenóis inibem o crescimento e a atividade de bactérias lácticas nas azeitonas de mesa, enquanto podem constituir uma fonte de carbono para outros microrganismos presentes. As azeitonas chegam a apresentar mais de 7% de polifenóis em base seca (Maestro-Durán et al., 1994).

Nas azeitonas, o polifenol majoritário é a oleuropeína, responsável pela origem do sabor amargo (Brenes et al., 1995).

O tratamento mais utilizado para a remoção da oleuropeína é submergir os frutos em uma solução de hidróxido de sódio com uma concentração de 1,6% a 2,5% até que esta atinja 2/3 da polpa. Com este processo, a soda hidrolisa as ligações estéricas e retira o amargor da azeitona (Malheiro, 2010).

3.4.8 Vitaminas

Segundo o banco de dados nacional do departamento da agricultura norte americano (USDA), nas azeitonas em salmoura se encontram: carotenos, precursores da vitamina A (393 UI / 100 g), vitamina E (3,81 mg / 100 g), vitamina C (0 mg / 100 g), vitamina B1 - tiamina (0,021 mg / 100g), vitamina B2 - riboflavina (0,007 mg / 100g),

vitamina B3 - niacina (0,237 mg / 100g), vitamina B6 - piridoxina (0,031 mg / 100g) e vitamina K (1,4 µg / 100g).

As vitaminas lipossolúveis praticamente permanecem na polpa até o fim da elaboração enquanto as hidrossolúveis se perdem dependendo da elaboração.

3.4.9 Pigmentos

Na polpa das azeitonas estão presentes pigmentos lipossolúveis como a clorofila a e b, pigmentos hidrossolúveis como a antocianina e diversos carotenóides (Balatsouras, 1996).

A clorofila não é extraída com a solução de hidróxido de sódio nem com as lavagens com água tampouco com a salmoura que cobre as azeitonas durante a fase de elaboração, envase e comercialização (Balatsouras, 1996).

Os carotenóides são mais resistentes aos distintos tratamentos aos quais as azeitonas verdes são submetidas, mas devido a sua estrutura molecular são mais sensíveis a oxidação (Balatsouras, 1996).

As antocianinas se encontram somente nos frutos maduros (Maestro-Durán et al., 1994). São sensíveis indicadores de pH já que mudam de cor segundo o pH da polpa e da salmoura. Com um valor de pH baixo (3,8 - 4,5) apresentam uma cor púrpura que muda gradualmente para o violeta e para o preto quando o pH alcança um ponto neutro (Balatsouras, 1996).

3.4.10 Compostos inorgânicos

A polpa da azeitona é rica em componentes inorgânicos, predominando o potássio (20 - 70 mg / 100 g de polpa), seguido do cálcio (46 - 59 mg / 100 g de polpa), magnésio (4 - 5 mg / 100 g de polpa), ferro (0,2 - 5,5 mg / 100 g de polpa) e fósforo (5 -16 mg / 100 g de polpa) (Lima et al., 2006).

Uma importante quantidade destes minerais se perde durante as distintas fases de elaboração. Somente o conteúdo de sódio sofre um aumento devido à adição de NaCl em todas as preparações comerciais de azeitonas (Ünal e Nergiz, 2003).

Contudo, a quantidade de compostos inorgânicos que permanecem ao fim do processo é suficiente para considerar as azeitonas uma boa fonte de minerais para o organismo humano e para as bactérias lácticas que se desenvolvem na salmoura (Balatsouras, 1996).

3.5 DEFEITOS CAUSADOS POR MICRORGANISMOS

Os frutos podem sofrer diferentes tipos de defeitos se a população de microrganismos não for bem controlada nas diversas etapas de fermentação.

Apesar de não causarem riscos à saúde, alguns destes microrganismos afetam a qualidade do produto final, alterando as características sensoriais das azeitonas e em alguns casos chegam a promover a perda de até 18% dos frutos (Carmona et. al, 2011).

3.5.1 Pontos brancos

Os pequenos pontos brancos geralmente são colônias de *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus sp* que se desenvolveram durante o processo de fermentação e podem sobreviver ao tratamento térmico. É um dos defeitos mais comuns associados com as azeitonas processadas. Podem ser encontrados em todos os cultivares e tipos de azeitona que passam por fermentação láctica. As azeitonas que resultam com este tipo de defeito perdem seu valor comercial, mas estão perfeitamente normais e saudáveis em outros aspectos (Pires e Freitas, 1994).

3.5.2 Amolecimento

A presença fungos, leveduras e bactérias do gênero *Bacillus* podem ser responsáveis pelo amolecimento de azeitonas (Pires e Freitas, 1994).

Nortje e Vaughn (1953) isolaram de salmoura de azeitonas duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* e *B. pumilus*, produtoras de enzimas responsáveis pelo amolecimento dos frutos.

Balatsouras e Vaughn (1958) isolaram de salmoura de azeitonas 35 espécies de fungos. Destas 23 eram do gênero *Fusarium* e 8 do gênero *Penicillium*. *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Paecilomyces* e *Verticillium* foram representados apenas por uma única espécie. Todas as espécies apresentaram tolerância a baixo pH, resistência ao NaCl, capacidade de decomposição de ácido e pectina, sendo assim, potenciais agentes de deterioração das azeitonas.

Ferguson et al. (2005), King e Vaughn (1961) atribuíram o amolecimento de azeitonas a 5 gêneros de bactérias pectinolíticas, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Paraclobacterium*, *Aeromonas* e *Achromobacter* devido a detecção da produção das enzimas pectinaesterase entre outras que também degradam a pectina.

Quintana et al. (2003) isolaram das variedades de azeitonas lechina, verdial e hojiblanca, sete espécies de leveduras, das quais *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* foram relacionadas com o amolecimento dos frutos em salmoura.

Hernández et al. (2007) isolaram dos frutos in natura e em salmoura os seguintes gêneros de leveduras: *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Sacharomyces*, *Trichosporum*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* associados ao amolecimento do frutos.

Vaughn et al. (1969 e 1972) atribuíram o defeito de amolecimento em azeitonas pretas as espécies *R. minuta* e *Hansenula anomala* (*P. anomala*).

3.5.3 Olho de peixe e bolsas de gás

Pires e Freitas (1994) caracterizaram o defeito de bolhas e bolsas de gás como consequência do elevado teor de NaCl ou acidez, durante o processo de elaboração da azeitona. Praphailong e Fleet (2007) verificaram que a espécie *K. marxianus* pode crescer em concentrações de NaCl entre 7,5% a 10% e pH 3,0.

A formação de bolhas ou bolsões na superfície das azeitonas, devido ao acúmulo de gás em seu interior, decorrente da ação de bactérias gram-negativas dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* e *Aeromonas* que produzem gás carbônico e hidrogênio (Borbolla y Alcalá et al., 1960).

Vaughn et al. (1972) atribuíram o defeito de formação de bolsas de gás em azeitonas pretas a espécie *Hansenula anomala*. Fernández et al. (1997) atribuíram o mesmo defeito a espécie *C. krusei*.

O controle da acidificação da salmoura e da concentração de NaCl ajuda na prevenção deste tipo de defeito.

3.5.4 Fermentação butírica e “Zapatera”

Quando o início da fermentação é retardado e o pH permanece alto, o excesso de manitol e glicose na salmoura favorece o desenvolvimento de bactérias butíricas (Pires e Freitas, 1994). A ação destas favorece a produção de cheiro e sabor penetrantes e desagradáveis, tornando os frutos impróprios ao consumo. A acidificação inicial e o uso de culturas lácticas contribuem na prevenção dessa alteração. Gililand e Vaughn (1943) identificaram a espécie *Clostridium butyricum* como causadora da fermentação butírica das azeitonas.

“Zapatera” pode se desenvolver no final da fermentação láctica se a acidez não for bem controlada (Pires e Freitas, 1994). Neste caso, o desenvolvimento de bactérias propiônicas, podem causar a decomposição do ácido láctico e um aumento no pH permitindo o crescimento de *Clostridium* (Plastourgos e Vaughn, 1957). Kawatomari e Vaughn (1956) foram os primeiros a associar as espécies de *Clostridium* a este defeito.

Os frutos apresentam um cheiro e gosto peculiares. Quando muito afetadas, as azeitonas se perdem totalmente, mas se a alteração for descoberta a tempo, podem ser salvas acidificando o meio para um pH menor do que 4,0.

3.5.5 Filme de leveduras

É freqüente a presença do filme de leveduras esbranquiçadas com aspecto liso ou rugoso na superfície da salmoura das azeitonas em conserva. Estes filmes são compostos por leveduras oxidativas que oxidam o ácido láctico, ocasionando um aumento de pH que pode contribuir para o aparecimento de microrganismos causadores de putrefação, além de influenciar negativamente as características comerciais do produto (Marsilio e Cichelli, 1992; Pereira et al., 2008).

3.6 LEVEDURAS PRESENTES EM SALMOURAS DE AZEITONAS

Nas salmouras de azeitonas pode se encontrar uma mistura de bactérias, leveduras e bolores. Algumas dessas leveduras podem ser produtoras de enzimas pectinolíticas e estar associadas ao amolecimento das azeitonas (Balatsouras e Vaughn, 1958).

Vaugh et al. (1972) isolaram de salmouras de azeitonas acidificadas e com baixo teor de NaCl, leveduras das espécies *Hansenula anomala*, *Saccharomyces kluyveri* e *Saccharomyces oleaginous*, produtoras de pectinesterase e poligalacturonase.

Marquina et al. (1992) isolaram 6 gêneros de leveduras das salmouras de azeitonas em Portugal, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodoturula*, *Saccharomyces* e *Debaryomyces*. A *Debaryomyces* pode ocasionar o amolecimento dos frutos durante o processo de fermentação e estocagem (Faid et al., 1994).

Hernández et al. (2007) isolaram de salmoura de azeitonas acidificadas e com alto teor de NaCl, os gêneros de leveduras *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporum*, *Debaryomyces*, *Rhodoturula*, *Torulaspora*. As espécies de leveduras predominantes foram *P. anomala* (22,2%), *K. marxianus* (16,7%), *S.*

cerevisiae (12,5%), *C. laurentii* (9,7%), *T. cutaneum* (8,3%), *C. maris* (6,9%), *D. hansenii* (5,6%), *R. glutinis* (2,8%), *T. delbrueckii* (1,4%).

As espécies de leveduras *D. hansenii*, *C. rugosa* e *R. minuta* possuem alta atividade pectinolítica e por isso são indesejáveis durante o processo de fermentação das azeitonas verdes. Já as espécies *P. anomala* e *K. marxianus* possuem uma atividade pectinolítica variada e podem ser utilizadas como culturas iniciadoras nos processos de fermentação bem como podem causar defeitos de amolecimento e formação de bolsas de gás (Hernández et al., 2007).

Pereira et al. (2008) isolaram de salmoura de azeitona acidificada, as espécies *C. krusei* (70,8%), *C. glabrata* (12,5%), *G. penicillatum* (8,3%), *C. boidinni* (4,2%) e *Kloeckera ssp* (4,2%). A presença das leveduras patogênicas como *C. krusei* e *C. glabrata* em salmoura pode estar associada à falta de higiene durante o processo de manipulação ou processamento.

3.7 FATORES UTILIZADOS NA CONSERVAÇÃO DE AZEITONAS QUE AFETAM O DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURAS EM SALMOURAS

É comum a combinação de baixas temperaturas, pH, NaCl e conservantes químicos na estabilização de produtos que são susceptíveis a deterioração por leveduras.

O pH e o NaCl tem um efeito sinérgico em relação ao crescimento das leveduras deteriorantes a baixas temperaturas. Betts et al. (2000) observaram 6 gêneros de leveduras, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces* e *Debaryomyces*. Esta última foi a que se mostrou mais tolerante a combinação dos efeitos de pH, NaCl e temperatura. A espécie *Z. bailii* cresceu em 4 dias em salmoura a 8%, pH 5,0 e temperatura de 22°C, mas em salmoura a 6,4%, pH 3,5 e temperatura de 8°C seu crescimento foi em 22 dias. A espécie *C. parapsilosis* cresceu em 3 dias em salmoura a 8%, pH 2,5 e temperatura de 22°C, mas em mesmas condições de pH e salmoura, temperatura de 8°C, não houve crescimento.

Betts et al. (2000) verificaram que a baixa temperatura o crescimento das leveduras é mais lento do que a temperatura ambiente. A fase lag variou entre 15 e 875 horas quando a temperatura era de 15°C e 1°C, respectivamente.

Lopez et al. (2006) estudaram o efeito da temperatura, concentração de NaCl e pH para a espécie *P. anomala*. A um valor de pH menor que 4,2 ocorreu um aumento na fase lag de crescimento, entretanto quando as células estavam adaptadas ao meio, o pH

não influenciou seu crescimento. Concentrações de NaCl maior que 7% e baixas temperaturas dificultaram o crescimento da levedura.

Vaugh et al. (1972) observaram que as espécies *Hansenula anomala*, *Saccharomyces kluyveri* e *Saccharomyces oleaginous*, cresceram rapidamente em salmoura com pH entre 3,0 e 6,5 e teor de NaCl entre 2% e 8%. Ao aumentar o teor de NaCl para 10% a 16%, houve crescimento somente da espécie *Hansenula anomala*. O efeito inibidor do NaCl é potencializado a baixos valores de pH (Balatsouras e Vaugh, 1958).

Praphaloing e Fleet (1997) observaram que as cepas de *K. marxianus*, mostraram um crescimento significativo nas concentrações de NaCl de 7,5% a 10% e pH 3,0. Já as cepas de *P. anomala* não apresentaram crescimento a pH 2,0 e ausência de NaCl, porém a um mesmo valor de pH e a uma concentração de NaCl maior que 2,5% as leveduras apresentaram crescimento e resistência a altas concentrações de NaCl.

Betts et al. (2000) observaram que a espécie de *C. guilliermondii*, por exemplo, cresceu em 1 dia em salmoura a 8% e pH 4,5, enquanto, em salmoura a 8% e pH 2,5, levou 3 dias para ter o mesmo crescimento. A espécie *C. parapsilosis* cresceu somente em salmouras a 4,8%, 3,2% e 1,6%, quando o pH era 4, 3,5 e 3,0, respectivamente.

Asehrou et al. (2002) observaram as espécies *Lactobacillus plantarum* e *P. anomala* em salmouras a uma concentração de 5% de NaCl, aciduladas com ácido láctico, pH entre 4,0 e 5,0 e 0,05% de sorbato. Os resultados mostraram que o uso de sorbato, associado a um pH 4,0 reduziram a deterioração do produto.

O ácido sórbico e seus sais têm efeito antimicrobiano em alimentos ácidos e pouco ácidos. Na forma de sal (sorbato), atua principalmente inibindo a ação de leveduras e bolores e parcialmente a ação as bactérias das azeitonas em conserva. O uso máximo permitido em salmouras de acordo com as normas do Codex é de 0,05% e pode provocar um escurecimento na salmoura das azeitonas (Marsílio e Cichelli, 1992).

O benzoato de sódio pode ser utilizado para inibir o crescimento de bactérias, leveduras e bolores com atividades máxima em uma faixa de pH compreendida entre 2,5 e 4,5 (Marsílio e Cichelli, 1992). O uso máximo permitido em salmouras de acordo com as normas do Codex é de 0,1% e apresenta a vantagem de ser inodoro e incolor.

Arroyo-López et al. (2008) estudaram o efeito do sorbato e ácido sórbico com as espécies *Saccharomyces cerevesiae*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia occidentalis*. O ácido sórbico apresentou um efeito inibidor maior que o ácido benzóico entre um pH 3,5 a 4,0. A um pH 4,5 o ácido benzóico não inibiu o crescimento das leveduras mesmo em altas concentrações (2500 mg/l). Quando a mistura de sorbato e benzoato era composta por

menos de 1000 mg/L de ácido sórbico, não houve efeito inibidor no crescimento das leveduras. A espécie *Issatchenkia occidentalis*, mostrou ser a mais resistente aos efeitos do sorbato e ácido benzóico.

Quintana et al. (2005) estudaram o efeito dos ácidos acético e láctico na evolução do crescimento das leveduras em salmoura das espécies *Pichia anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta*, *Saccharomyces cerevesiae*, *Candida diddensii*, *Candida famata* e *Debaryomyces hansenii*. Na presença de ácido acético ocorreu uma diminuição na população de leveduras durante os 30 dias de cultivo, enquanto na presença de ácido láctico a população de leveduras permaneceu praticamente inalterada, havendo um crescimento paulatino com o passar dos dias de cultivo.

Nielsen e Arneborg (2007) estudaram o efeito do ácido cítrico e pH 3,0, 4,0 e 4,5 no crescimento e metabolismo anaeróbico das espécies de *Saccharomyces cerevesiae* e *Zygosaccharomyces bailii*. O ácido cítrico inibiu o crescimento das duas espécies e teve seu efeito potencializado com o aumento dos valores de pH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE SALMOURA DE AZEITONAS

Foram obtidas amostras (fornecidas por uma empresa de conservas do estado de São Paulo) de diferentes variedades de azeitonas em conserva de consumo no Brasil: arauco, manzanilla, gordal, azapa, picual e empeltre. Para o isolamento dos microrganismos selecionaram-se amostras de salmouras de azeitonas, que se encontravam armazenadas em barrica e de azeitonas envasadas que apresentavam perda de vácuo e turvamento da salmoura durante a estocagem (Tabela 1).

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

AMOSTRA	VARIEDADE DE AZEITONA
A	Arauco
B	Manzanilla
C	Gordal
D	Azapa
E	Empeltre
F	Picual

4.2 ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE LEVEDURAS

Retirou-se uma alíquota de 10 ml das amostras de salmoura selecionadas e realizaram-se diluições decimais seriadas (até 1:1000) em solução salina 0,85% estéril. Espalhou-se uma alíquota de 0,1 ml dessas diluições na superfície de quatro diferentes meios de cultura: Agar dextrose batata (PDA - Merck), Agar triptona glicose extrato de levedura (TGY), apresentado na tabela 2, Agar triptona glicose extrato de levedura acidificado para pH 3,6 (TGY acidificado), apresentado na tabela 3, ambos, conforme descrito em Deak (2008) e Agar dicloran com rosa bengala (DRBC - Difco). Incubou-se as placas por 5 dias a 25°C. Após este período, selecionaram-se as colônias com diferentes características culturais de tamanho, forma, elevação, bordos, superfície, pigmentação e detalhes ópticos.

Para conservação das culturas, transferiram-se as colônias com diferentes características de tamanho, textura, forma, relevo, bordos e pigmentação para um tubo de ensaio contendo Agar TGY e incubou-se a 25°C por 72 horas. Os tubos de ensaio foram armazenados em geladeira a 4°C e a cada 3 meses foram realizados novos repiques (Figura 1).

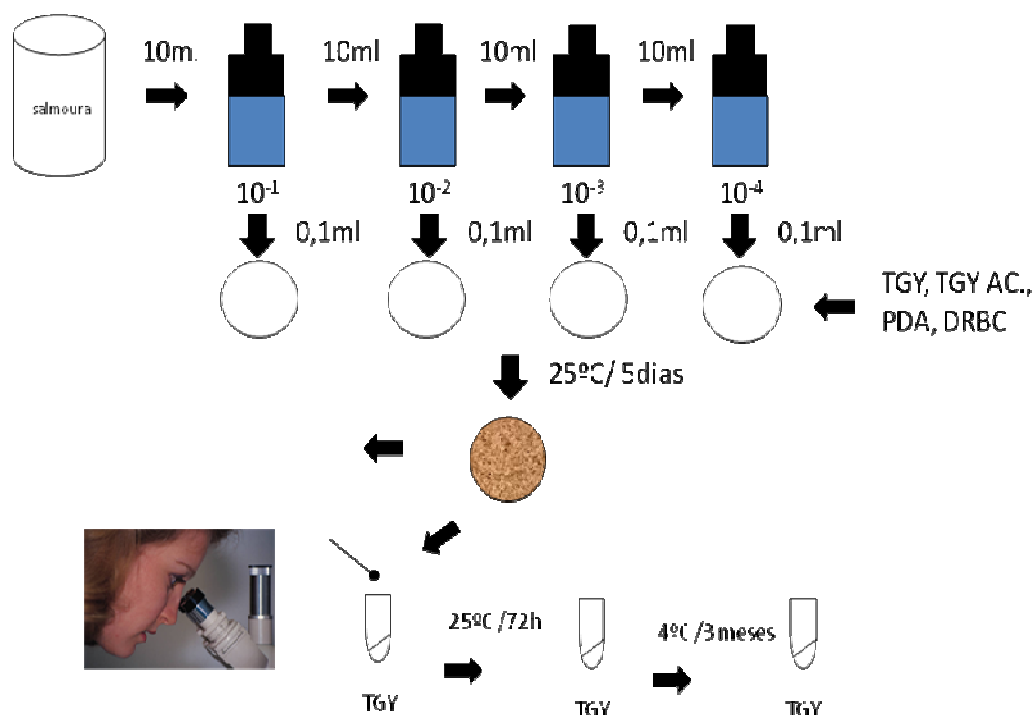


FIGURA 1. Isolamento e conservação das leveduras

Realizou-se uma observação microscópica à fresco das leveduras selecionadas de forma a auxiliar na identificação das mesmas em microscópio marca Olympus, modelo CBA – 213, série 187/41. As dimensões das leveduras foram determinadas utilizando-se um disco micrométrico previamente calibrado para a objetiva de 100 aumentos. As lâminas foram preparadas com culturas das leveduras cultivadas em Agar TGY por 24 horas, sendo 2 lâminas para cada levedura isolada e em cada lâmina foram determinadas as dimensões de 5 células de levedura.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TGY

MEIO	(g/L)
Glicose	100
Triptona	5
Extrato de levedura	5
Agar	15

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TGY ACIDIFICADO

MEIO	(g/L)
Glicose	100
Triptona	5
Extrato de levedura	5
Agar	15
Ácido acético glacial	1ml

4.3 ISOLAMENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS

Retirou-se uma alíquota de 1 ml das amostras de salmoura das azeitonas e realizaram-se diluições decimais seriadas (até 1:100) em tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% estéril. Transferiu-se uma alíquota de 1 ml para placas de Petri vazias em duplicata. Adicionou-se cerca de 15 ml de Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS – Oxoid) previamente fundido e resfriado a 45°C. As amostras foram homogeneizadas e após completa solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas em jarra de anaerobiose (Oxoid) com sistema de exaustão de oxigênio (Anaerogen® – Oxoid), conforme descrito em Downes e Ito (2001).

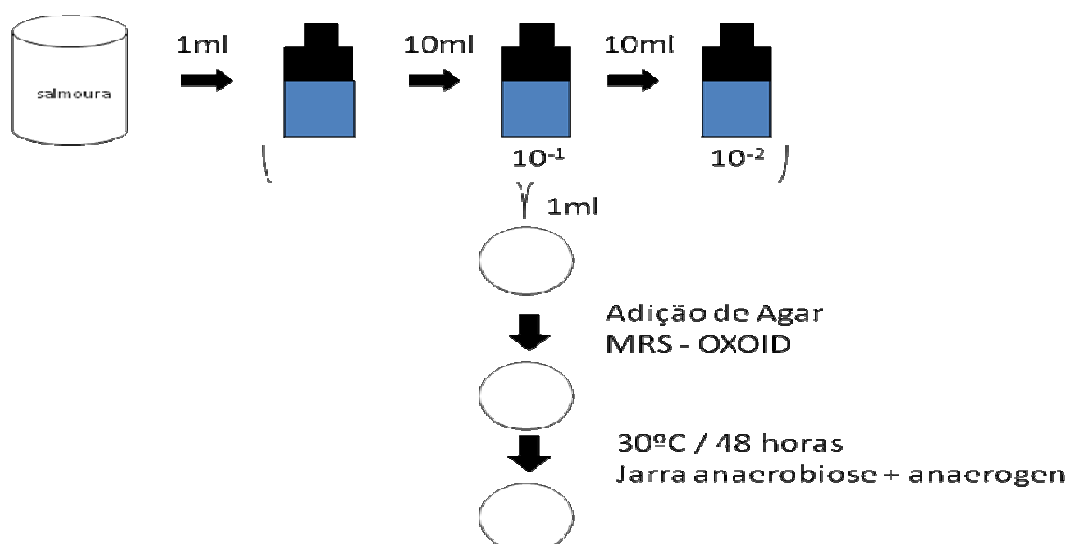


FIGURA 2. Isolamento de bactérias lácticas

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

4.4.1 Sistema de identificação API® 20C AUX (bioMérieux®)

Para a identificação das leveduras isoladas utilizou-se o sistema de identificação API® 20C AUX (bioMérieux®).

Para a realização do teste, as colônias isoladas foram previamente incubadas em meio TGY a 25°C por 24 horas. Com uma alça de inoculação estéril uma fração da cultura foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 ml de solução salina a 0,85% estéril, de forma a obter uma suspensão de leveduras com turvação equivalente a 2 da

escala McFarland, o que corresponde a $6,0 \times 10^8$ UFC/ml. Esta suspensão foi utilizada para a inoculação das galerias do sistema API® 20C AUX (bioMérieux®) (Figura 3).

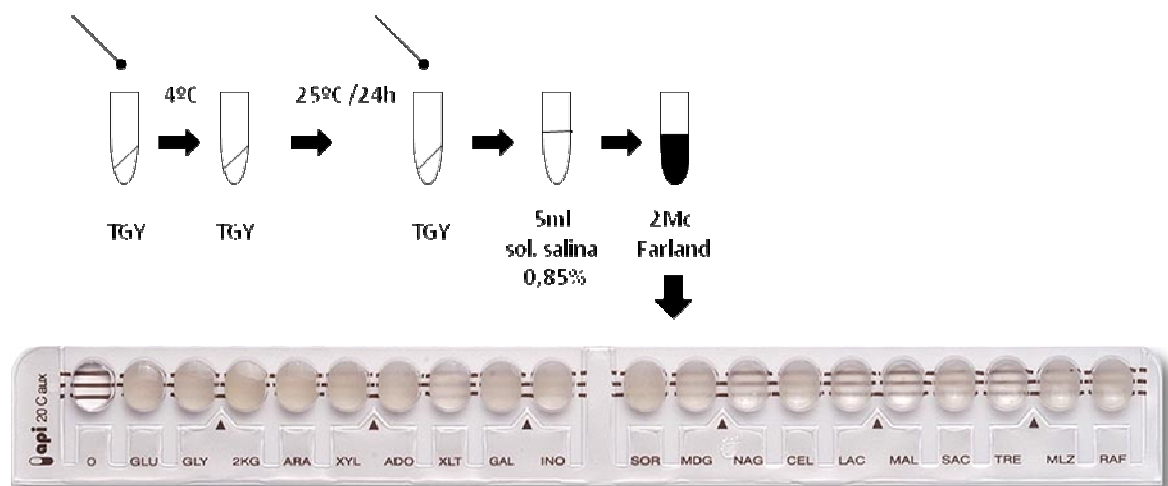


FIGURA 3. Identificação das leveduras isoladas

4.4.2 Método Clássico

A identificação foi realizada através da análise das características macro e micromorfológicas, reprodutivas e fisiológicas de acordo com Kurtzman et al., (2011).

4.4.2.1 Tubo germinativo

Com o auxílio de uma alça calibrada transferiu-se uma pequena fração da levedura, previamente cultivada em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD), apresentado na tabela 4, para 0,5 mL de soro fetal bovino. Incubou-se a 37°C por um período máximo de 3 horas. As leituras foram realizadas na 1ª, 2ª e 3ª hora de incubação. Para efetuar a leitura, removeu-se uma gota da suspensão e colocou-se em uma lâmina de microscopia estéril, esta coberta com uma lamínula também estéril e observou-se a produção ou não de tubo germinativo em microscopia óptica com aumento de 400X (Almeida, 2009) (Figura 4).

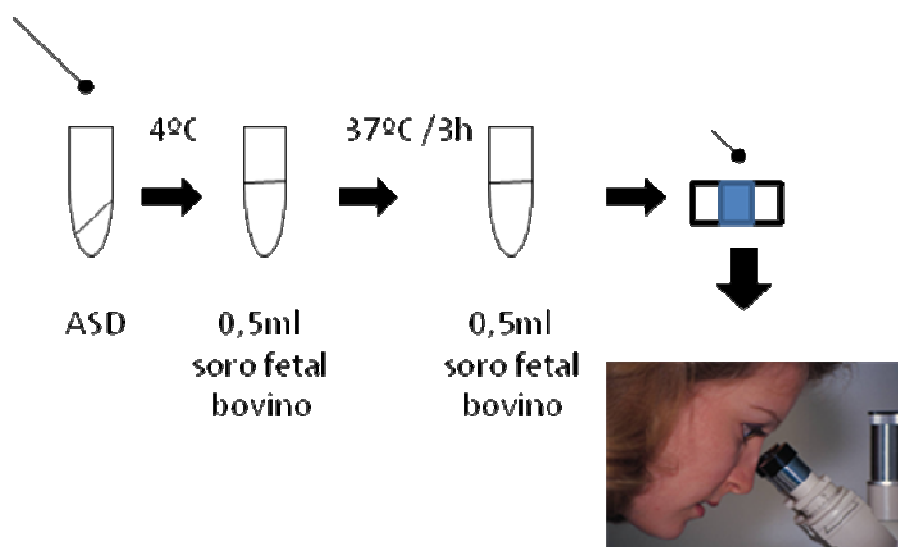


FIGURA 4. Teste do tubo germinativo

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA ASD

MEIO	(g/L)
Dextrose	40
Peptona	10
Agar	15

4.4.2.2 Microcultivo em lâminas

Os aspectos micromorfológicos das colônias são observados através da técnica de microcultivo em lâminas. Nem sempre estas características são observadas através dois meios usuais utilizados na micologia, como o Agar Sabouraud, para tanto, utiliza-se o Agar fubá acrescido de TWEEN 80.

Na realização do teste, uma placa de Petri contendo um suporte e sob este uma lâmina de microscopia, previamente montada e esterilizada foi utilizada. Sobre a lâmina colocou-se 3 ml de Agar fubá acrescido de TWEEN 80 (Tabela 5), ainda líquido, e esperou-se solidificar. Em seguida a levedura em estudo fora semeada na superfície do meio, fazendo-se 3 estrias paralelas. Colocou-se uma lamínula perpendicularmente as estrias. Para evitar a dessecação do meio de cultura, colocou-se um pedaço de papel filtro embebido com água estéril dentro da placa de Petri. A incubação deu-se a temperatura de 25°C a 30°C por um período mínimo de 3 a 6 dias. A observação em microscopia óptica com aumento de 400X (Almeida, 2009), fora realizada a partir do 3º dia de incubação para verificação da presença de estruturas fúngicas nas colônias de

leveduras em questão. Para tanto, colocou-se uma gota do corante lactofenol azul, em uma lâmina de microscopia estéril (Figura 5).

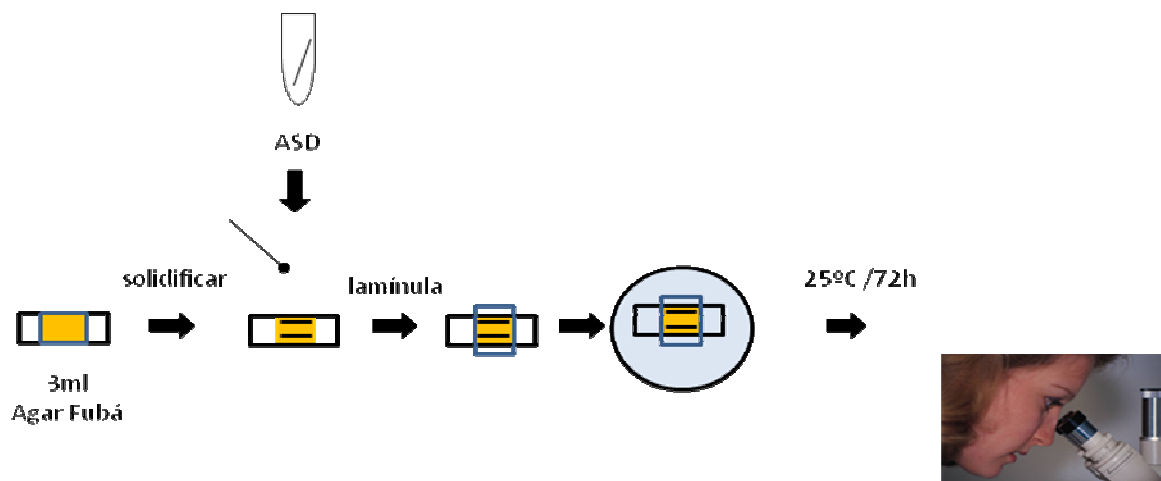


FIGURA 5. Microcultivo em lâminas

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO DO MEIO ÁGAR FUBÁ

MEIO	(g/L)
Farinha de milho amarela	41,6
Ágar	12,6
Tween 80	10ml

4.4.2.3 Auxanograma

Para a realização dos testes bioquímicos, as colônias isoladas foram previamente incubadas em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD), apresentado na tabela 4, a 32°C por 24 horas. Com uma alça de inoculação estéril uma fração da cultura foi transferida para cada tubo de ensaio contendo: 2,0 ml, 1,0 ml e 1,2 ml de solução salina a 0,85% estéril, de forma a obter uma suspensão de leveduras com turvação equivalente a 5 da escala McFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^9$ UFC/ml. Essas suspensões foram utilizadas para a realização dos testes de assimilação de carboidratos e de nitratos e fermentação de carboidratos, respectivamente (Figura 6).

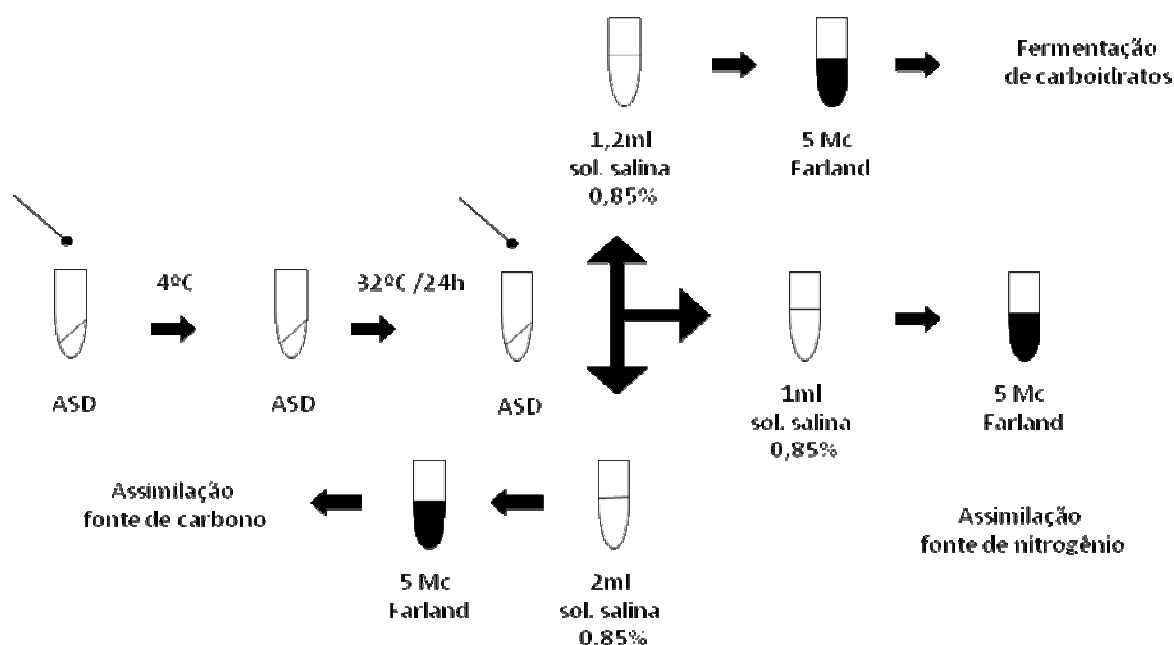


FIGURA 6. Auxonograma

4.4.2.3.1 Assimilação de fontes de carbono

Utilizou-se o meio basal desprovido de qualquer fonte de carbono, Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco).

Adicionou-se a cada tubo de ensaio 40 mL de meio YNB e autoclavou-se a 121°C por um período de 15 minutos e estocou-se em geladeira por um período máximo de 30 dias. No momento da execução dos testes os tubos foram fundidos e mantidos em banho Maria a temperatura entre 45°C e 50°C.

Em seguida adicionou-se 1ml do inóculo ao meio e verteu-se em placas de Petri (150 X 20 mm) anteriormente identificadas de maneira equidistante com os açúcares (inositol, sacarose, lactose, dulcitol, melibiose, rafinose, raminose, maltose, trealose, xilose e glicose - controle positivo) a serem testados. Homogeneizou-se o meio com o inóculo através de movimentos suaves de rotação da placa.

Após a solidificação do meio, adicionou-se uma pequena alíquota dos açúcares “*in natura*”, como fonte de carbono, na superfície do meio utilizando-se de uma espátula de madeira estéril. Após um período de 10 minutos as placas foram incubadas a 30°C com a face que continha os açúcares voltados para cima por um período de 7 dias (Almeida, 2009) (Figura 7).

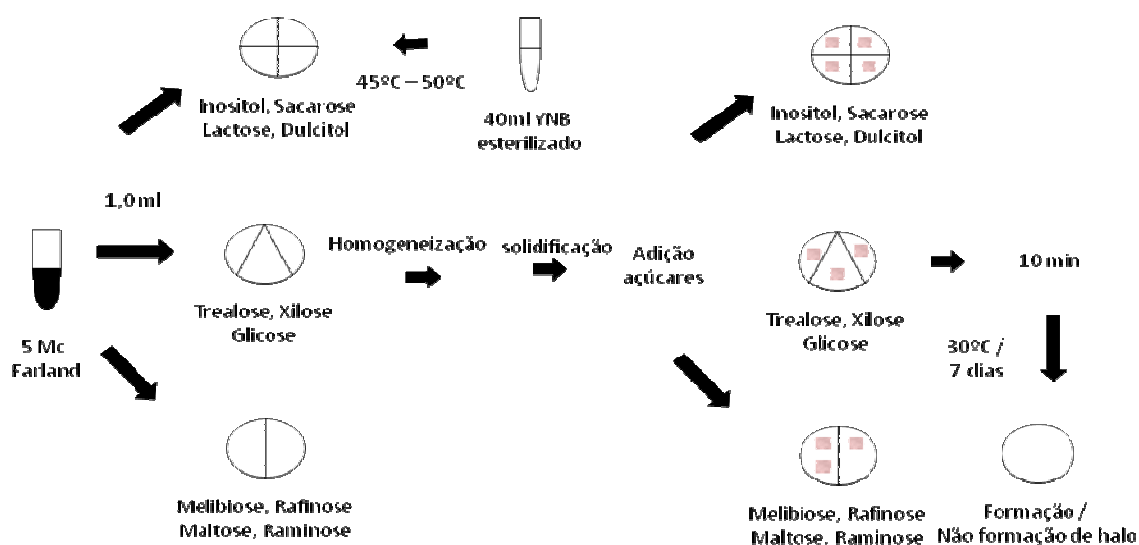


FIGURA 7. Assimilação de fontes de carbono

4.4.2.3.2 Assimilação de fontes de nitrogênio

Utilizou-se o meio basal desprovido de qualquer fonte de nitrogênio, Yeast Carbon Base (YCB - Difco).

Adicionou-se a cada tubo de ensaio 20 mL de meio YCB e autoclavou-se a 121°C por um período de 15 minutos e estocou-se em geladeira por um período máximo de 30 dias. No momento da execução dos testes os tubos foram fundidos em banho Maria a temperatura entre 45°C e 50°C.

Em seguida adicionou-se 1 ml do inóculo ao meio e verteu-se em placas de Petri (100 X 15 mm) anteriormente identificadas com os compostos nitrogenados (nitrato de potássio e peptona) a que foram testados. Homogeneizou-se o meio com o inóculo através de movimentos suaves de rotação da placa.

Após a solidificação do meio, adicionou-se uma pequena alíquota dos compostos nitrogenados “*in natura*”, como fonte de nitrogênio, na superfície do meio utilizando-se de uma espátula de madeira estéril. Após um período de 10 minutos as placas foram incubadas a 30°C com a face que continha os compostos nitrogenados voltada para cima por um período de 7 dias (Almeida, 2009) (Figura 8).

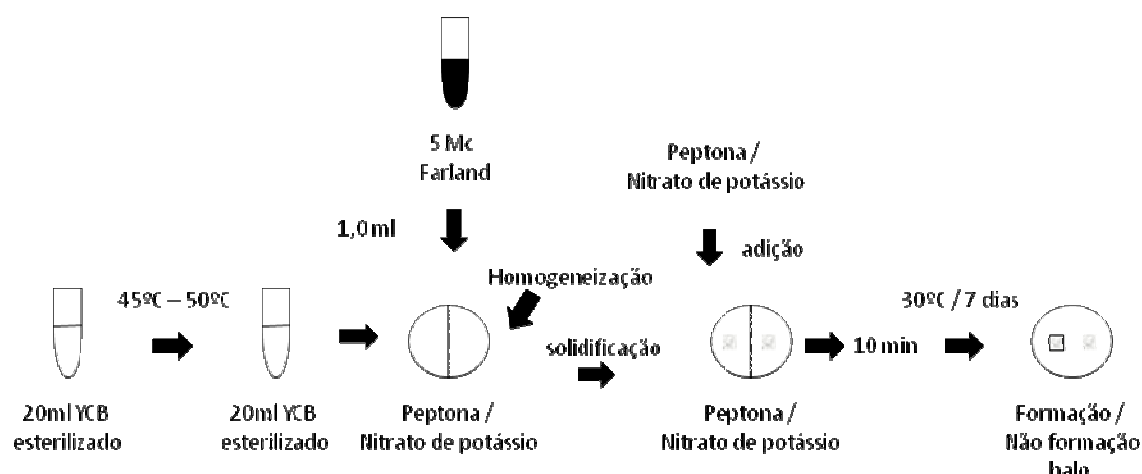


FIGURA 8. Assimilação de fontes de nitrogênio

4.4.2.4 Zimograma

Adicionou-se a cada tubo de ensaio 3 ml de meio basal (Tabela 6), contendo tubo de Durhan invertido. Autoclavou-se a 121°C por 15 minutos, estocou-se em geladeira. No momento da execução dos testes adicionou-se ao meio 1,5 ml de uma solução a 6% dos açúcares (glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose e trealose) e homogeneizou-se. Em seguida retirou-se 0,2 mL da suspensão da levedura anteriormente preparada (item 4.4.2.3) e semeou-se na superfície do meio. A incubação deu-se a 37°C por um período de 10 - 14 dias (Almeida, 2009) (Figura 9).

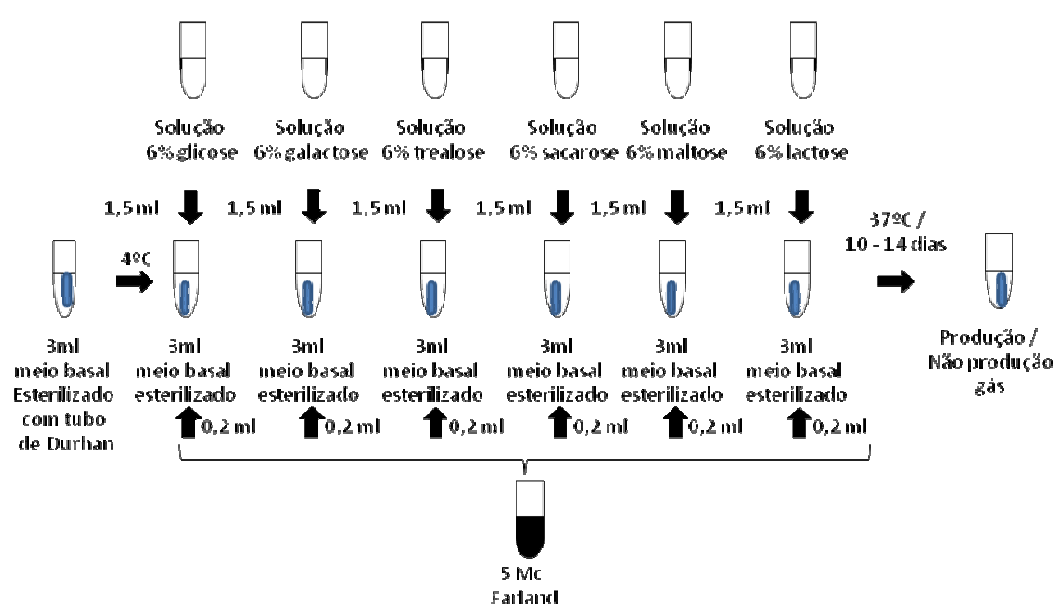


FIGURA 9. Zimograma

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA ZIMOGRAMA

MEIO	(g/L)
Azul de bromotimol	0,05
Extrato de levedura	4,5
Peptona	7,5
Etanol a 95%	3ml

4.5 INFLUÊNCIAS DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl, pH E TIPO DE ÁCIDO ORGÂNICO NO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA EM SALMOURA

Selecionou-se uma linhagem de levedura isolada que foi utilizada para avaliar a influência da concentração de NaCl, pH, e tipo de ácido empregado na salmoura no desenvolvimento das leveduras. Os açúcares utilizados na composição salmoura, definidos de acordo com Quintana et al. (1997), estão apresentados na tabela 7.

TABELA 7 – AÇÚCARES UTILIZADOS NA COMPOSIÇÃO DA SALMOURA

AÇÚCARES	(mg/L)
Glicose	181
Frutose	109
Manitol	63
Sacarose	179

Para a realização dos experimentos foi empregada a metodologia do planejamento fatorial, onde foram avaliados 3 fatores: teor de NaCl, pH e tipo de ácido empregado na salmoura. Cada variável foi estudada em 2 níveis de acordo com um planejamento fatorial completo 2^3 totalizando 8 experimentos, que foram repetidos em 3 blocos (BRUNS et al., 1995). A tabela 8 apresenta os níveis de cada variável independente e a tabela 9 as condições dos 8 experimentos. Como variável dependente, foi determinada a população de levedura nas salmouras no tempo 0 e a cada 07 dias, totalizando 28 dias de incubação.

TABELA 8 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES E NÍVEIS ESTUDADOS

Variáveis independentes	Variáveis Codificadas	Níveis	
		-1	+1
% NaCl	X ₁	4,5	5,5
pH	X ₂	3,5	4,5
Ácido	X ₃	lático	cítrico

TABELA 9 – ENSAIOS SEGUNDO O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³

Experimento	(X ₁) % NaCl	(X ₂) pH	(X ₃) Ácido
S1	4,5	3,5	cítrico
S2	5,5	3,5	cítrico
S3	4,5	4,5	cítrico
S4	5,5	4,5	cítrico
S5	4,5	3,5	lático
S6	5,5	3,5	lático
S7	4,5	4,5	lático
S8	5,5	4,5	lático

4.5.1. Preparo do inóculo de levedura

Com uma alça de inoculação estéril uma fração da cultura de levedura isolada, armazenada a 4°C, foi transferida para um tubo contendo agar TGY e incubada a 32°C por 24 horas. Após esse período, uma nova fração da cultura foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo TGY e incubada a 32°C por 24 horas. Centrifugou-se o meio de cultura com crescimento da levedura em centrífuga (Fanem®, modelo 206 – R), na rotação máxima de 5000 rpm por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento de levedura foi lavado com 5,0 ml de solução salina 0,85% estéril. Repetiu-se o procedimento de lavagem e centrifugação por mais 2 vezes.

Acrescentou-se 5,0 ml de solução salina 0,85% estéril ao sedimento de levedura e transferiu-se uma alíquota de 1 ml para 9 ml de solução salina a 0,85% estéril. Essa suspensão foi utilizada como inóculo das salmouras. A concentração desse inóculo (cerca de 10⁶ UFC/mL) foi determinada conforme descrito no item 4.5.3.

4.5.2. Cultivo da levedura em salmoura

Utilizou-se 0,1 ml da suspensão de levedura, preparada conforme descrito no item 4.5.1, para inocular 10 ml de cada salmoura, em tubo de ensaio, cujo teor de NaCl, pH e tipo de ácido, foram estabelecidos de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 9).

Os tubos de ensaio com as salmouras inoculadas foram incubados a 32°C por 28 dias. Em intervalos de 7 dias foram retiradas amostras dos diferentes tubos de ensaio para quantificação da concentração de levedura.

4.5.3. Quantificação da levedura

Retirou-se uma amostra de 1,0 mL da suspensão de levedura em salmoura e dilui-se em 9,0 mL de solução salina 0,85% estéril. A partir desta suspensão realizou-se 10 diluições seriadas que foram semeadas em triplicata.

Espalhou-se com a alça de Drigalski, uma alíquota de 0,1 ml de diluições adequadas na superfície do agar TGY e incubou-se as placas por 48 horas, a 32°C. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado nas placas contendo entre 30 e 300 colônias e os resultados expressos em log UFC/ml.

4.5.4. Análise estatística

Para avaliação dos resultados realizou-se a análise de variância, utilizando-se o software MinitabTM (Minitab, Inc. State College, EUA), versão 15. Foram considerados significativos os efeitos dos fatores com p-valor < 0,1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE LEVEDURA

A tabela 10 apresenta o crescimento das leveduras presentes nas amostras de salmouras de azeitonas comerciais, nos 4 meios de culturas utilizados.

TABELA 10 – CRESCIMENTO DE LEVEDURA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

AMOSTRA	PDA ^a	TGY ^a	TGY ac ^a	DRBC ^a
A	++	+++	+++	++
B	++	+++	+++	-
C	++	+++	+++	-
D	++	+++	+++	-
E	++	+++	+++	-

^a crescimento: - sem crescimento; ++ crescimento moderado; +++ crescimento abundante

Observa-se na tabela 10 que os meios TGY e TGY acidificado proporcionaram o maior crescimento de leveduras a partir de amostras de salmouras de azeitonas.

Por outro lado, o meio DRBC não se mostrou adequado para o isolamento de leveduras enquanto o meio PDA apresentou um número moderado de colônias, mas inferior ao meio TGY.

A partir destes resultados, selecionou-se o meio TGY para o isolamento e multiplicação das leveduras.

5.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIA LÁTICA

Não foi detectada presença de bactéria láctica em todas as amostras de salmoura de azeitonas comerciais avaliadas.

5.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS ISOLADAS E DIMENSÕES DAS LEVEDURAS.

A tabela 11 apresenta as características morfológicas das colônias isoladas de diferentes amostras de salmoura de azeitonas e as dimensões das leveduras. Foram isoladas 22 colônias, separadas em 8 grupos, segundo suas características morfológicas.

TABELA 11 – CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS E DIMENSÕES DAS CÉLULAS

Isolado	Produto	Tamanho (µm)	Forma	Relevo	Bordos	Textura	Pigmentação
17	E	(4,6±0,6) x (6±1)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Branca
19	B	(3,6±0,9) x (5±1)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Branca
20	E	(4±2) x (8±1)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Branca
21	E	(4,0±0,7) x (5,6±0,6)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Branca
22	C	(4,8±0,8) x (9±1)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Rosa
12	D	(1±0) x (7±2)	Circular	Chata	Inteira	Lisa	Rosa
2	A	(3,8±0,4) x (6±1)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Branca
3	A	(4,4±0,6) x (6±2)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Branca
4	B	(5±0) x (5,6±0,9)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Branca
6	B	(4±0) x (8±2)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Branca
13	D	(4±1) x (6±2)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Branca
1	A	(3±0) x (7±1)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Rosa
8	C	(4,6±0,6) x (8±1)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Rosa
16	E	(3,2±0,5) x (3,8±0,8)	Irregular	Elevação	Ondulado	Rugosa	Rosa
10	C	(4±1) x (10±1)	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Branca
14	E	(5±1) x (7±2)	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Branca
5	B	(4±1) x (7±3)	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Rosa
9	C	(4,2±0,8) x (13±1)	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Rosa
11	C	(4±0) x (8,2±0,8)	Irregular	Convexa	Ondulado	Rugosa	Rosa
15	E	(4,2±0,5) x (6±2)	Irregular	Centro saliente	Ondulado	Rugosa	Borda branca centro rosa escuro
7	B	(3,6±0,9) x (4,8±0,5)	Irregular	Centro saliente	Ondulado	Rugosa	Rosa
18	C	(6±2) x (12±2)	Irregular	Centro saliente	Ondulado	Rugosa	Rosa

Lente de imersão EA100

5.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS LEVEDURAS

5.4.1 Sistema de identificação API® 20C AUX (bioMérieux®)

Os resultados obtidos da identificação bioquímica das leveduras, utilizando o sistema API® 20C AUX (bioMérieux®) estão apresentados na tabela 12.

TABELA 12 – LEVEDURAS IDENTIFICADAS

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO
3	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
6	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
7	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
9	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
12	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
13	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
14	<i>Candida krusei</i> , ou <i>Candida inconspicua</i>
19	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>
22	<i>Candida krusei</i> ou <i>Candida inconspicua</i>

5.4.2 Método clássico

Os resultados obtidos no teste do tubo germinativo foram negativos para os isolados analisados. A produção de tubo germinativo é presuntivo para a espécie de *Candida albicans*. Considera-se o tubo germinativo positivo quando há produção de um filamento fino, cilíndrico, originado de um blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constrição, quer na base ou ao longo de sua extensão.

Os resultados obtidos no teste de microcultivo em lâminas foram positivos para os isolados analisados. Consideram-se os resultados positivos quando as leveduras incubadas em um meio com Agar fubá e Tween-80 apresentam a capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras com blastoconídios e ramificados. De acordo com as características micromorfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura.

Na tabela 13 são apresentados os resultados obtidos no auxonograma em relação à capacidade da levedura assimilar os carboidratos. Quando esta assimilou o carboidrato, observou-se a formação de halo ao redor da fonte de carbono. Somente ao redor da glicose houve crescimento em todos os isolados.

TABELA 13 - ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO

ISOLADO	CARBOIDRATOS											
	Glicose ^a	Inositol ^a	Sacarose ^a	Lactose ^a	Dulcitol ^a	Melibiose ^a	Rafinose ^a	Raminose ^a	Maltose ^a	Trealose ^a	Xilose ^a	Celobiose ^a
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a assimilação de carbono: - sem crescimento; + crescimento

Na tabela 14 são apresentados os resultados obtidos no auxonograma em relação à capacidade da levedura assimilar fontes de nitrogênio. Quando o isolado assimilou a fonte de nitrogênio, observou-se a formação de um halo ao redor do isolado em análise. Em todos os isolados houve formação de halo somente na presença de peptona.

TABELA 14 - ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO

ISOLADO	PEPTONA ^a	NITRATO DE POTASSIO (KNO ₃) ^a
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	-
8	+	-
9	+	-
10	+	-
11	+	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	-
16	+	-
17	+	-
18	+	-
19	+	-
20	+	-
21	+	-
22	+	-

^a assimilação de nitrogênio: - sem formação de halo; + formação de halo

Os resultados obtidos no zimograma estão apresentados na tabela 15. Todos os isolados em análise não apresentaram habilidade para fermentar nenhum dos açúcares, pois não houve presença de bolhas no interior do tubo de Durham, indicando que não ocorreu a produção de CO₂.

TABELA 15 – FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

ISOLADO	CARBOIDRATOS					
	GLICOSE ^a	LACTOSE ^a	TREALOSE ^a	RAFINOSE ^a	SACAROSE ^a	MALTOSE ^a
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-

^a produção de gás: - ausência de bolhas; + presença de bolhas

Através dos resultados obtidos da identificação bioquímica das leveduras, utilizando o sistema API® 20C AUX (bioMérieux®) e apresentados na tabela 12, verificou-se que as leveduras presentes em salmouras de azeitonas tendiam entre as espécies *Candida krusei* ou *Candida inconspicua*. Para uma melhor definição dos resultados realizou-se testes complementares.

De acordo com Spolidorio et al. (2009) a utilização de um único teste para identificação de espécies de *Candida* não é efetivo. Devem-se utilizar métodos fenotípicos combinados para melhor identificação do gênero.

Segundo Land et al. (1979) o sistema API 20C para identificação de leveduras não é suficiente para separar *Candida krusei*, *Candida lipolytica* e *T. capitatum* porém quando combinado a identificação microscópica da morfologia atinge 97% de correlação com métodos rápidos convencionais.

A formação de tubo germinativo ocorre em algumas espécies do gênero *Candida* e é considerado padrão para identificação de *Candida albicans* (Spolidorio et al. 2009). Nos isolados analisados, todos os resultados para tubo germinativo foram negativos e a identificação da espécie como *Candida albicans* foi descartada.

No teste de microcultivo em lâminas não foram observados clamidioconídeos nem artroconídios, o que também descaracterizou a presença de cepas de *Candida albicans* (Ribeiro, 1997).

De acordo com os resultados obtidos nas características micro e macro morfológicas das colônias, bem como os teste bioquímicos de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de carboidratos nos levam a inferir que a espécie de cândida isolada de salmoura de azeitona era *Candida krusei*.

Segundo Hayford e Jacobsen (1999) as colônias da espécie *Candida krusei* caracterizam-se por serem planas, com cor branca a acinzentada, bordos irregulares e com formação de uma película rastejante quando cultivadas em caldo e crescimento a 37°C.

Fernández et al. (1997) isolou a espécie *Candida krusei* de azeitona preta natural e atribuiu a ela o defeito de formação de bolsas de gás nos frutos.

Pereira et al. (2008) isolou a espécie *Candida krusei* de salmoura de azeitona proveniente de produtos adquiridos no mercado comercial e de produtores agrícolas. Em 70,8% das amostras analisadas, essa levedura foi predominante.

5.5 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl, pH e TIPO DE ÁCIDO NO DESENVOLVIMENTO DE LEVEDURA EM SALMOURA

Para o estudo da influência dos fatores NaCl, pH e ácido foi utilizado somente um isolado, já que todos os isolados foram identificados como da mesma espécie.

A população da levedura isolada, nas diferentes salmouras ao longo de 28 dias de incubação a 32°C estão apresentadas nas tabelas 16, 17 e 18 respectivamente.

A concentração inicial de levedura nas salmouras dos conjuntos de experimentos apresentados nas tabelas 16, 17 e 18, foram respectivamente 4,86, 4,93 e 4,99 log ufc/ml.

TABELA 16 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 1

Experimento 1	Log ufc/ml			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
S1	5,10	4,38	4,69	4,89
S2	5,38	5,26	4,93	4,87
S3	5,08	5,45	5,29	5,39
S4	4,97	4,82	4,12	4,95
S5	3,96	4,31	5,17	3,81
S6	3,13	4,83	4,48	3,18
S7	4,10	4,02	4,05	5,13
S8	5,31	5,19	5,04	5,10

TABELA 17 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 2

Experimento 2	Log ufc/ml			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
S1	5,23	5,34	5,12	5,20
S2	4,94	5,38	4,60	5,20
S3	5,33	5,32	3,41	5,29
S4	3,95	3,64	3,22	3,54
S5	3,33	5,42	3,91	3,92
S6	3,57	4,58	3,61	3,55
S7	5,34	NQ*	5,22	4,60
S8	4,09	4,96	5,11	5,19

*NQ: não quantificado

TABELA 18 – POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO NO EXPERIMENTO 3

Experimento 3	Log ufc/ml			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
S1	5,20	5,05	4,58	5,04
S2	5,45	5,17	5,33	5,10
S3	5,37	5,15	5,24	5,33
S4	5,48	5,42	5,60	5,19
S5	5,42	3,20	5,05	3,65
S6	3,68	3,61	5,42	5,06
S7	5,60	5,38	5,41	5,13
S8	5,36	5,35	5,40	5,57

TABELA 19 – MÉDIA DA POPULAÇÃO DA LEVEDURA EM SALMOURA (LOG UFC/ml) DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO

Experimento	Log ufc/ml			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
S1	5,2±0,1	4,9±0,5	4,8±0,3	5,0±0,2
S2	5,3±0,3	5,3±0,1	5,0±0,4	5,1±0,2
S3	5,3±0,2	5,3±0,2	4,6±1	5,3±0
S4	4,8±0,8	4,6±0,9	4,3±1	4,6±0,9
S5	4,2±1	4,3±1	4,7±0,7	3,8±0,1
S6	3,5±0,3	4,3±0,6	4,5±0,9	3,9±1
S7	5,0±0,8	4,7±1	4,9±0,7	5,0±0,3
S8	4,9±0,7	5,2±0,2	5,2±0,2	5,3±0,3

Nas figuras de 10 a 13 estão representadas as populações médias de levedura a uma mesma concentração de NaCl (4,5% ou 5,5%), e um mesmo pH (3,5 ou 4,5), com variação do tipo de ácido (lático e cítrico) durante os 28 dias de incubação.

Na figura 10, observa-se o efeito do tipo de ácido para uma salmoura a 4,5% de NaCl e pH 3,5 durante os 28 dias de cultivo.

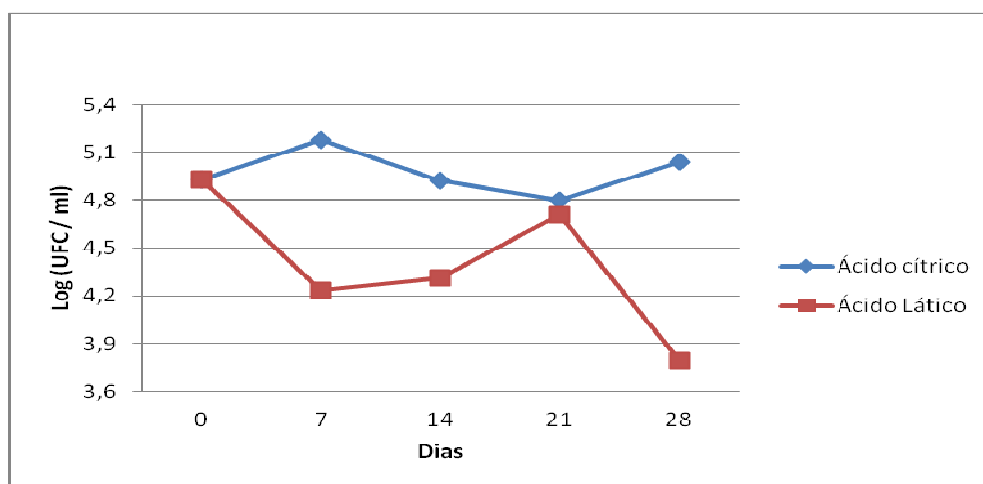


FIGURA 10. População média da levedura em salmoura a 4,5% de NaCl e pH 3,5 (log ufc/ml) durante 28 dias de cultivo

A população de leveduras em salmoura a 4,5% de NaCl e pH 3,5 quando acidificada com ácido láctico apresentou valores significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparado com a salmoura acidificada com ácido cítrico durante os 28 dias de incubação (Figura 10).

Na figura 11, observa-se o efeito do tipo de ácido para uma salmoura a 5,5% de NaCl e pH 3,5.

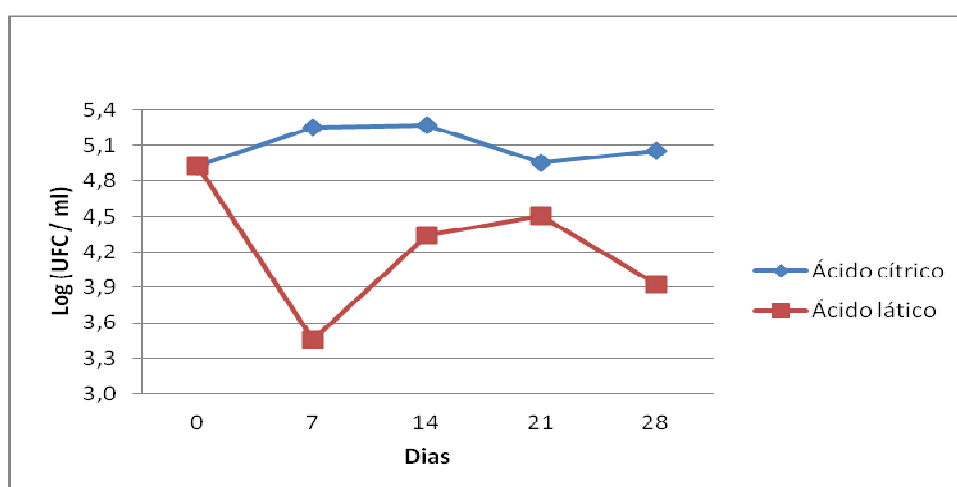


FIGURA 11. População média da levedura em salmoura a 5,5% de NaCl e pH 3,5 (log ufc/ml) durante 28 dias de cultivo

A salmoura a 5,5% de NaCl e pH 3,5 quando acidificada com ácido láctico apresentou valores da população de leveduras significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparado com a salmoura acidificada com ácido cítrico durante os 28 dias de incubação (Figura 11).

Na figura 12, observa-se o efeito do tipo de ácido para uma salmoura a 5,5% de NaCl e pH 4,5.

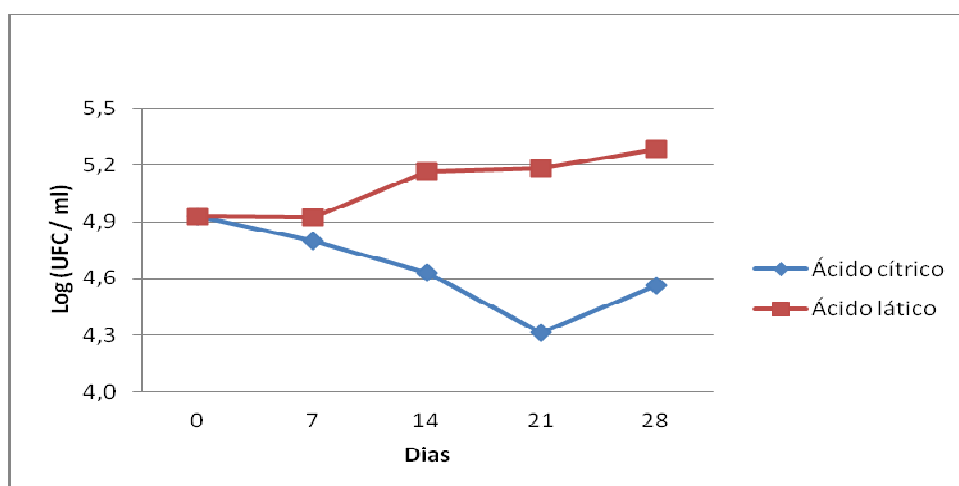


FIGURA 12. População média da levedura em salmoura a 5,5% de NaCl e pH 4,5 (log ufc/ml) durante 28 dias de cultivo

O tempo de incubação não influenciou significativamente ($p > 0,05$) a população de leveduras nas salmouras a 5,5% de NaCl e pH 4,5, acidificadas com ácido láctico e ácido cítrico (Figura 12).

Na figura 13, observa-se o efeito do tipo de ácido para uma salmoura a 4,5% de NaCl e pH 4,5.

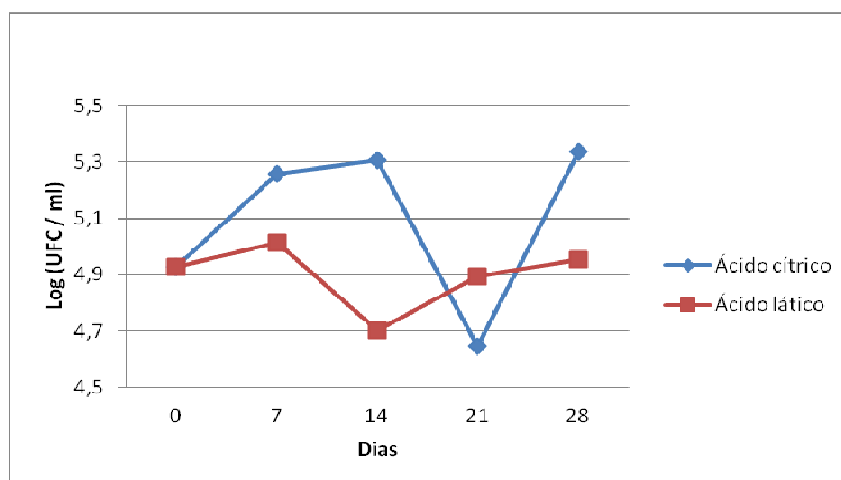


FIGURA 13. População média da levedura em salmoura a 4,5% de NaCl e pH 4,5 (log ufc/ml) durante 28 dias de cultivo

A população de leveduras em salmoura a 4,5% de NaCl e pH 4,5 quando acidificada com ácido láctico não apresentou valores significativamente diferentes ($p > 0,05$) quando comparado com a salmoura acidificada com ácido cítrico durante os 28 dias de incubação.

Em resumo, durante o armazenamento, a influência do tipo de ácido foi verificada apenas nas salmouras com pH 3,5. Esse comportamento foi observado tanto nas salmouras a 4,5% de NaCl como nas salmouras com 5,5% de NaCl (Figuras 10 e 11).

Quintana et al. (2005) também verificaram um efeito inibidor do ácido láctico para um pH 3,5. A concentração de NaCl a esse valor de pH e também para pH 4,0 não teve efeito sobre a população de levedura.

Por outro lado na salmoura com pH 4,5 o uso de ácido láctico ou o uso de ácido cítrico não apresentou valores significativos ($p > 0,05$) na população de leveduras em salmoura. Esse comportamento foi verificado tanto na salmoura a 4,5% de NaCl como na salmoura com 5,5% de NaCl (Figuras 12 e 13).

Verificou-se que o tempo não influenciou significativamente ($p > 0,05$) a população de levedura da salmoura, após a análise de variância realizada. Pode-se dizer que a população de leveduras ficou praticamente constante durante os 28 dias de cultivo para todos os ensaios realizados.

A partir dos valores da população de levedura, tabela 16, foram calculados os efeitos dos fatores avaliados na população das leveduras, durante 28 dias de cultivo a 32°C, que estão apresentados na tabela 20.

TABELA 20 – EFEITO DOS FATORES PARA A LEVEDURA DURANTE 28 DIAS DE CULTIVO

Termo	7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
X ₁ (NaCl)	-0,31	0,237	0,04	0,885	-0,02	0,941	-0,07	0,723
X ₂ (pH)	0,46	0,086*	0,23	0,401	0,01	0,954	0,57	0,012*
X ₃ (ácido)	0,71	0,012*	0,40	0,166	-0,14	0,649	0,50	0,025*
X ₁ X ₂ (NaCl.pH)	0,03	0,890	-0,14	0,602	0,00	0,996	-0,14	0,480
X ₁ X ₃ (NaCl.ácido)	0,12	0,633	-0,20	0,465	-0,06	0,838	-0,30	0,152
X ₂ X ₃ (pH.ácido)	-0,65	0,021*	-0,36	0,202	-0,41	0,205	-0,68	0,004*
X ₁ X ₂ X ₃ (NaCl.pH.ácido)	-0,30	0,247	-0,36	0,206	-0,24	0,442	-0,24	0,246

*Efeitos com p-valor <0,1 foram considerados significativos

De acordo com a tabela 20, são significativos, em 7 e 28 dias de cultivo, os efeitos do pH e ácido e as interações entre a pH e ácido.

Quintana et al. (2005) também observaram que o efeito do ácido e do pH são significativos no desenvolvimento de levedura em salmoura de azeitonas. Já López et al. (2006) verificaram que eram significativos ($p < 0,05$) no crescimento das leveduras os efeitos da temperatura e teor de sal.

Em 14 dias e 21 dias de cultivo não foram significativos os efeitos do pH e ácido e tampouco suas interações.

Durante os 28 dias de cultivo o efeito do NaCl não foi significativo ($p > 0,05$).

Betts et al. (2000) verificou um efeito sinérgico entre a concentração de NaCl e a temperatura de incubação em relação ao crescimento de leveduras em salmoura. O tempo de crescimento das leveduras aumentou com a redução de temperatura (22°C a 1°C), o aumento da concentração de NaCl (0,5% a 10%) independente do valor de pH.

Com 7 dias de cultivo o uso de ácido láctico a um pH 3,5 mostrou ser mais eficiente na redução a população de levedura quando comparado ao ácido cítrico a um mesmo pH. A um pH 4,5 o tipo de ácido praticamente não influenciou a população de levedura, conforme já discutido anteriormente (Figura 14).

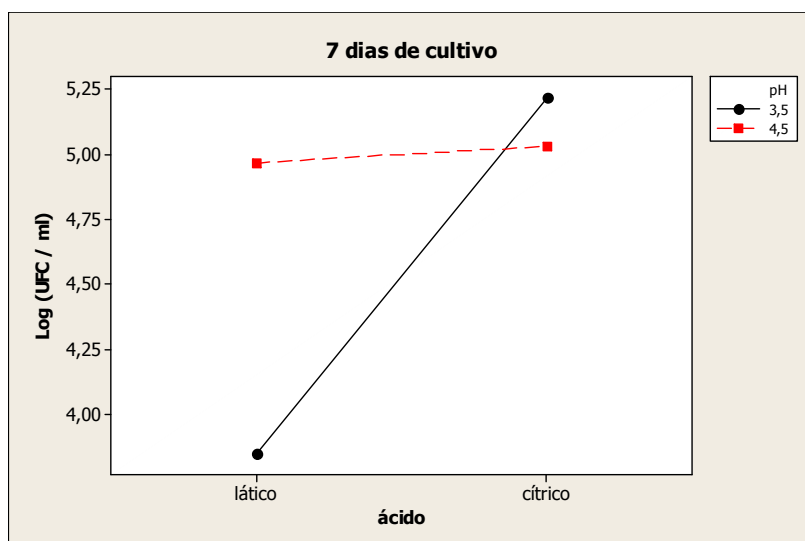


Figura 14. Interação entre o pH e ácido para a população de levedura no 7º dia de cultivo.

O mesmo comportamento foi observado nas salmouras armazenadas por 28 dias (figura 15). Em pH 3,5, a população média de levedura nas salmouras acidificadas com ácido láctico era cerca de 1,5 log ufc/ml menor que nas salmouras com pH 4,5. Por outro lado a variação de pH nas salmouras acidificadas com ácido cítrico não influenciou significativamente a população de levedura.

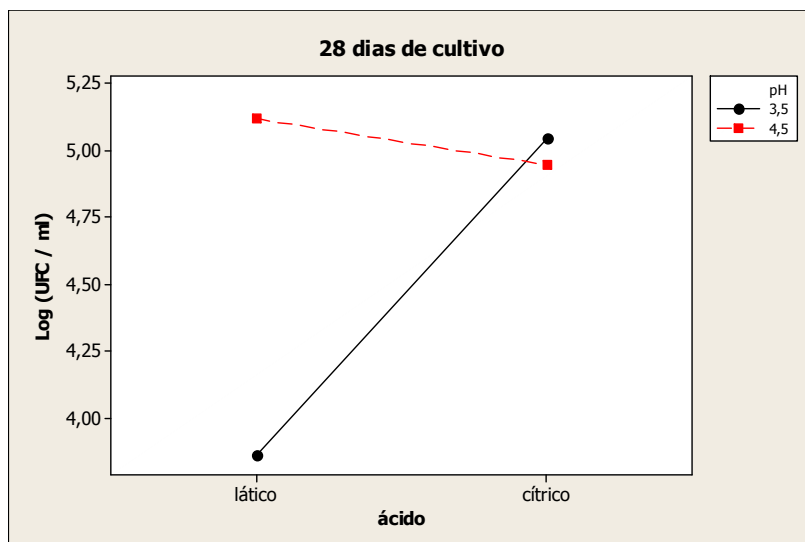


Figura 15. Interação entre o pH e ácido para a população de levedura no 28º dia de cultivo.

Os ácidos cítrico e láctico podem exercer sua atividade antimicrobiana devido a redução do pH do meio e da ação da forma não dissociada, que tem capacidade de atravessar a membrana celular e afetar o metabolismo dos microrganismos. Essa

permeabilidade está relacionada com o tamanho e o caráter hidrofóbico da molécula (Viola, 2006).

O ácido láctico é capaz de atravessar a membrana celular dos microrganismos em seu estado não dissociado e dissociar-se no interior da célula, produzindo íons H^+ que diminuem o pH da célula. A célula, ao tentar manter o pH constante, elimina prótons e faz com que haja um gasto energético maior, reduzindo o crescimento microbiano. Por sua vez os anions $RCOO^-$ do ácido, impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique (Bellaver e Scheuermann, 2004).

A eficácia dos ácidos orgânicos puros é resultado da concentração, do pKa (potencial de dissociação) e da capacidade de quelação dos ácidos. O pKa representa o valor de pH do meio em que um ácido monocarboxilado se encontra 50% dissociado. O ácido láctico apresenta valor de pKa 3,86 e o ácido cítrico pKa 3,09, 4,74 e 5,41 (Gava et al, 2008).

Para um valor de pH 3,0, 86,6% do ácido láctico está na sua forma não dissociada enquanto que o ácido cítrico apresenta 53% de sua forma não dissociada. Já a um valor de pH 4,0, 39,2% do ácido láctico está na sua forma não dissociada e o ácido cítrico 18,9%.

6 CONCLUSÕES

A levedura deteriorante isolada de salmoura de azeitona foi identificada como *Candida krusei*.

Existe uma interação significativa entre o pH e o tipo de ácido utilizado na salmoura de azeitona. O ácido láctico apresentou maior efeito inibidor em relação ao ácido cítrico, em pH 3,5. Em pH 4,5 não houve diferença entre os ácidos com relação ao grau de inibição das leveduras.

A variação da concentração de NaCl de 4,5 para 5,5% não apresentou efeito no controle do desenvolvimento de *Candida krusei* em salmoura de azeitona durante os 28 dias de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. R. **Apostila de Micologia Clínica**. São Paulo: USP, p 27 - 38, 2009.
- ARROYO-LÓPEZ, F.N., QUEROL, A., BAUTISTA-GALLEGO, J., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Role of yeasts in table olive production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p.189 – 196, 2008.
- ARSLAN, D. Physico – chemical characteristics of olive fruits of Turkish varieties from the province of Hatay. **Grasas y Aceites**, v. 63 (2), p.158 – 166, 2012.
- ASEHRAOU, A., MOHIEDDINE, S., FAID, M., SHERHRONCHNI, M. Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and molds in fermenting green olives. **Grasas y Aceites**, v. 48 (3), p.68 – 73, 1997.
- BALATSOURAS, G.D., VAUGHN, R.H. Some fungi that might cause softening of storage olives. **Food Research**, v. 23, p.235 – 243, 1958.
- BALATSOURAS, G. **Procesos de elaboración de las aceitunas de mesa**. Em: Enciclopedia Mundial Del Olivo, Consejo Oleícola Internacional. Madrid: Plaza & Janés, 1996. p.295 – 342.
- BARRANCO, D., FERNANDEZ-ESCOBAR, R., RALLO, L. **El cultivo del olivo**. 6. ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, 2008. 846 p.
- BELLAVER, C., SCHEUERMANN. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte**. Conferência AVISUI, 2004.
- BETTS, G. D., LINTON, P., BETTERIDGE, R. J. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. **Food Control**, v. 10, p. 27– 33, 1999.

BETTS, G. D., LINTON, P., BETTERIDGE, R. J. Synergistic effect of sodium chloride, temperature and pH on growth of a cocktail of spoilage yeasts: a research note.. **Food Microbiology**, v. 17, p. 47– 52, 2000.

BONTEMPO, M. **Azeite de oliva: sabor, estética e saúde**. Editora Alaúde, 2008. 148p.

BORBOLLA Y ALCALÁ, J. M. R., DÍEZ, M. J. F., CANCHO, F. G. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XIX. Nuevas experiencias sobre el “alambrado”. **Grasas y Aceites**, v. 11, p.256 – 260, 1960.

BORBRUNS, R. E., NETO, B. B., SCARMINIO, I. S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1995.

BRENES, M., REJANO, L., GARCÍA, P., SÁNCHEZ, A.H., GARRIDO, A. Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2702 - 2706, 1995.

CARMONA, S. J., CASTRO, A., NAVARRO, L. R. Proceso tradicional de aderezo de aceitunas verdes de mesa. Racionalización del cocido. **Grasas y Aceites**, v. 62 (4), p.375 – 382, 2011.

CHORIANOPOULOS, N. G., BOZIARIS, I. S., STAMATIOU, A., NYCHAS, G. J. E. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. **Food Microbiology**, v. 22, p.117 – 124, 2005.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa**. Madrid. 2004.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL. **Olivae**, n. 102, p 31 – 32, 2004.

CRUESS, W. V. **Produtos industriais de frutas e hortaliças**: livro texto para estudantes, pesquisadores e industriais. São Paulo: Edgard Blucher, 1973. v2

DEAK, Tibor. **Handbook of food spoilage yeasts**. 2. ed. Boca Raton: CRC, 2008. 325 p

DIAZ, R., GIL, L., SERRANO C., BLASCO M., BLASCO, J., MOLTO, E. Comparison of three algorithms in the classification of table olives by means of computer vision. **Journal of Food Engineering**, v61, p.101 – 107, 2004.

DOWNES, F. P.; ITO, K. eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, DC. APHA, 2001. 671 p.

FAID, M., AKHARTOUF, R., ASEHRAOU, A. Microorganisms associated with post-harvest green olives deteriorations in Marocco. **Grasas y Aceites**, v. 45 (5), p. 313 – 314, 1994.

FERNANDEZ, A. G., DIEZ, M. J. F., ADAMS, M. R. **Table Olives: production and processing**. 1. ed. Londres: Chapman & Hall, 1997. 479p.

FERGUSON, L., SIBBETT, G. S. **Olive production manual**. 2 ed. California: University of Agriculture and Natural Resources, 2005. 180p.

GAVA, A. J., SILVA, C. A. B., FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 2008. 505p.

GILILLAND, J. R., VAUGHN, R.H. Characteristics of butyric acid bacteria from olives. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p.315 – 322, 1943.

GÓMEZ, A. H. S., GARCÍA, P. G, NAVARRO, L. R. Elaboration of table olives. **Grasas y Aceites**, v 57 (1), p.86 – 94, 2006.

HAYFORD, A. E., JAKOBSEN, M. Characterization of *Candida krusei* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome profile, polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87 (1), p.29 – 40, 1999.

HEREDERO, M. G. S., HERNANDEZ, J. V. Variedades del olivar. **Hojas divulgadoras**, n. 2117, p 2 - 31, 2006.

HERNÁNDEZ, M., MARTÍN, A., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., CÓRDOBA, M. G. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **Food Microbiology**, v. 24, p 346 - 351, 2007.

HURTADO, A., REGUANT, C., ESTEVE-ZARZOSO, B., BORDONS, A., ROZÉS, N. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. **Food Research International**, v 41, p. 738 – 744, 2008.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. **The origin and expansion of olive tree**. 2010. Disponível em: www.internationaloliveoil.org. Acesso em: 05 jun. 2010.

KAWATOMARI, T. VAUGHN, R.H. Species of *Propionibacterium* associated with zapateria spoilage of olives. **Applied Microbiology**, v. 21, p.481 – 490, 1956.

KING, A. D.; VAUGHN, R.H. Media for detecting pecnolytic gram-negative bacteria associated with softening of cucumbers, olives and other plant tissues. **Journal of Food Science**, v. 26, p.635 – 643, 1961.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W, BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier; 2011. 2354p.

LAND, G. A., HARRISON, B. A., HULME, K. L., COOPER, B. H., BYRD, J. C. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a convencional method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, p 357 – 364.

LIMA, D. M., COLUGNATI, F. A. B., PADOVANI, R. M., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., SALAY, E., GALEAZZI, M. A. M. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. p 48 – 49.

LÓPEZ, F. N. A., FERNÁNDEZ, A. G. Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, yeast related to table olive fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.45 – 51, 2006.

LUH, B. S., WOODROOF, J.G. **Commercial vegetable processing**. 2 ed. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold, 1988. 600p.

MAESTRO – DURÁN, R., CABELLO, R. L., GUTÉRRIZ, V. R. Compuestos fenólicos del olivo. **Grasas y Aceites**, v. 45 (4), p. 265 – 269, 1994.

MALHEIRO, R. M. S. **Influência da cultivar nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas de azeitonas verdes descaroçadas**. Bragança, 2010. 120p (Dissertação de mestrado – Escola Superior Agrária de Bragança)

MARQUINA, D., PERES, C., PEINADO, J. M., MARTINS, I. S., MARQUES, J. F., CALDAS, F. V. Characterization of yeast population in olive brines. **Letters in applied Microbiology**, v. 14, p.279 – 283, 1992.

MARSILIO, V., CICHELLI, A. Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceitunas de mesa em salmuera. **Grasas y Aceites**, v. 43 (2), p. 66 – 74, 1992.

NARENDRANATH, N. V., THOMAS, K. C., INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26 (3), p. 171 – 177, 2001.

NARENDRANATH, N. V., THOMAS, K. C., INGLEDEW, W. M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 59 (4), p. 187 – 194, 2001.

NEVADO, F. P., MARTÍN, A., HERNÁNDEZ, A., CÓRDOBA, M. G., ARANDA, E. Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. **Food Microbiology**, v. 24, p.346 – 351, 2007.

NIELSEN, M. K., ARNEBORG, N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. **Food Microbiology**, v. 24 (1), p.101 – 105, 2007.

NORTJE, B. K., VAUGHN, R.M. The pectolytic activity of species of generous bacillus: qualitative studies with bacillus subtilis and bacillus pumilis in relation to the softening of olives and pickles. **Journal of Food Science**, v. 18, p.57 – 69, 1953

OLIVEIRA, A. F., VIEIRA NETO, J., GONÇALVES, E. D., VILLA, F., SILVA. L. F. O. Parâmetros físico-químicos dos primeiros azeites de oliva brasileiros extraídos em Maria da Fé, Minas Gerais. **Scientia Agraria**, v. 11 (3), p. 255 – 261, 2010.

PEIXOTO, C.F. **O preparo de azeitonas em conserva**. Rio Grande do Sul: U.S. Departamento of Agriculture, 1951. 25p.

PERES, C., FAID, M., BRITO, D., ASEHRAOU, A. Reducing the bloater spoilage incidence in fermented green olives during storage. **Grasas y Aceites**, v. 53 (3), p. 330 – 334, 2002.

PEREIRA, A. P., PEREIRA, J. A., BENTO, A., ESTEVINHO, M. L. Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2895 – 2902, 2008.

PRAPHAILONG, W., FLEET, G. H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, v. 14, p. 459 – 468, 1997.

PIRES, E. M. F., FREITAS, C. P. Caracterização de pontos brancos em azeitonas verdes. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 12 (2), p. 95 – 98, 1994.

PLASTOURGOS, S., VAUGHN, R.H. Species of *Propionibacterium* associated with zapateria spoilage of olives. **Applied Microbiology**, v. 5, p.267 – 271, 1957.

QUINTANA, M. C. D., LÓPEZ, F. N. A., FERNÁNDEZ, A. G. Modelling of the growth – no growth interface of *Issatchenkia occidentalis*, an olive spoiling yeast, as function of the culture media, NaCl, citric and sorbic acid concentrations: Study of its inactivation in the no growth region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p.150 – 159, 2007.

QUINTANA, M. C. D., GARCÍA, P. G., FERNÁNDEZ, A. G. Características Del crecimiento de levaduras de aceitunas de mesa a baja temperaturas. **Grasas y Aceites**, v 54 (3) p.264 – 271, 2003.

QUINTANA, M. C. D., GARCÍA, P. G., FERNÁNDEZ, A. G., ARROYO, F. N. Evolución del crecimiento em salmuera a baja temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa. **Grasas y Aceites**, v. 56 (1), p.9 – 15, 2005.

RAMALHEIRO, J. P. S. C. **Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades**. Lisboa, 2009. 41p (Dissertação de mestrado – Universidade Técnica de Lisboa)

RIBEIRO, E. L. Aspectos biológicos das leveduras do gênero *Candida* isoladas de

candidíase vaginal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31 (6), p.595, 1998.

SAVARD, T. BEAULIEU, C., GARDNER, N. J., CHAMPAGNE, C.P. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. **Food Microbiology**, v. 19, p. 363 – 373, 2002.

SPOLIDORIO, D. M. P., BORIOLO, M. F. G., ESTRELA C., SPOLIDORIO, L. C. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de Candida. **Robrac**, v. 18 (45), 2009.

SOUSA, R. A. **Análise da qualidade do processo de envase de azeitonas verdes através de algumas ferramentas do controle estatístico de processo**. Florianópolis, 2003. 102p (Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC)

TANILGAN, K., ÖZCAN, M. M., ÜNVER, A. Physical and chemical characteristics of five Turkish olive varieties and their oils. **Grasas y Aceites**, v. 58 (2), p.142 – 147, 2007.

TERAMOTO, J. R. S; BERTONCINI, E. I., PRELA-PANTANO. **Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil**. 2010. Artigo em hipertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/HistoricoOliveira/index.htm. Acesso em: 18/6/2011.

THOMAS, K. C., HYNES, S. H., INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68 (4), p. 1616 – 1623, 2002.

ÜNAL, K., NERGİZ, C. The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. **Grasas y Aceites**, v. 54 (1), p. 71 – 76, 2003.

VAUGHN, R. H., STEVENSON, K E., DAVE, B. A., PARK, H. C. Fermenting yeasts associate with softening and gas pocket formation in olives. **Applied Microbiology**, v. 23 (2), p.316 – 320, 1972.

VEIGA, C. M. **A epopéia do azeite**. Casa do azeite, p. 70– 79, 2009.

VIOLA, E. P. **Uso de acidificantes em dietas de frango de corte: Resíduos no trato digestivo e efeitos sobre o desempenho animal e morfologia intestinal**. Porto Alegre, 2006. 196p (Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

ZURITZ, C. A., MIRAS, N., MALDONADO, M. B. Influence of brine concentration on sugar and sodium chloride diffusion during the processing of the green olive variety arauco. **Grasas y Aceites**, v. 59 (3), p. 267 – 273, 2008.