

# APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAR O PROCESSO FERMENTATIVO DE AZEITONAS DE MESA

Application of an experimental plan to evaluate the fermentative process of  
table olives

Andréia Dalla Rosa<sup>1,2</sup>; Clarice Steffens<sup>3</sup>; Ilizandra Aparecida Fernandes<sup>4</sup>; Elisandra Rigo<sup>5</sup>;  
Geciane Toniazco Backes<sup>6</sup>; Sheila Mello da Silveira<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim. E-mail: andreia.dallarosa@ifc-concordia.edu.br

<sup>2</sup> Técnica em Educação Centro de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense-Campus Concórdia

<sup>3</sup> Doutora em Biotecnologia (UFSCar), professora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim

<sup>4</sup> Doutora em Engenharia de Alimentos (UFSC), professora Departamento de Engenharia de Alimentos, UDESC - Pinhalzinho, SC

<sup>5</sup> Doutora em Engenharia de Alimentos (URI), Pós-doutoranda do Departamento de Engenharia de Alimentos Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim

<sup>6</sup> Doutora em Ciências (UFRJ), professora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim

<sup>7</sup> Doutora em Ciências e Tecnologia de Alimentos (UFSC), professora do Instituto Federal Catarinense campus Concórdia

Data do recebimento: 13/05/2016 - Data do aceite: 01/07/2016

**RESUMO:** O objetivo do trabalho foi avaliar o processo de fermentação de azeitonas verdes pelo método espanhol, adicionando culturas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e cultura espontânea, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl (2,4 a 13,6%) e sacarose (0 a 0,8%). As variáveis de respostas monitoradas foram o pH, ácido lático, açúcar redutor e crescimento de bactérias lácticas. A fermentação foi acompanhada durante 120 dias, sendo que os tratamentos que apresentaram melhores condições químicas foram os tratamentos com 12% de NaCl e 0,7% de sacarose para ambas as culturas, espontânea (S4) e *L. plantarum* (L4) por apresentarem concentrações de ácido

lático superiores a 0,3%, valores de pH inferior a 4,3, além da concentração elevada de NaCl (12%), garantindo uma maior segurança ao produto elaborado.

**Palavras-chave:** Cultura espontânea. *Lactobacillus plantarum*. Bactérias lácticas.

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the green olives fermentation process by the Spanish method adding *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and spontaneous culture, using a Central Composite Rotational Design (CCRD) to evaluate the effect of different concentrations of NaCl (2.4 to 13.6%) and sucrose (0 to 0.8%). The variables observed were pH, lactic acid, reducing sugar and growth of lactic bacteria. The fermentation was monitored during 120 days and the treatments that showed better chemical condition were with 12% NaCl and 0.7% sucrose, for both spontaneous (S4) and *L. plantarum* (L4) cultures. They also, present concentrations higher than 0.3% of lactic acid, pH values below 4.3, in addition to the high concentration of NaCl (12%) ensuring greater product safety.

**Keywords:** Spontaneous culture. *Lactobacillus plantarum*. Lactic bacteria.

## Introdução

Apesar dos registros milenares na região do mediterrâneo, no Brasil, as pesquisas sobre processamento de azeitonas ainda são recentes. Como todo processo envolvendo alimentos, este deve seguir tecnologias e condições seguras, para isso, as azeitonas precisam ser cultivadas, colhidas, armazenadas, transportadas e processadas através de métodos que minimizem os danos físicos, bem como previnam contaminações químicas, físicas e microbiológicas (KAILIS e HARRIS, 2007; CORSETTI et al., 2012).

Neste sentido, a produção de azeitonas verdes pelo método Espanhol é um método de fermentação láctica com base em um processo empírico, em que os frutos são processados de forma a favorecer o desenvolvimento de bactérias lácticas na salmoura, convertendo os açúcares contidos nos frutos em grandes quantidades de ácido láctico sendo importante para a preservação das azeitonas através do decréscimo do pH (JIMENEZ DIAZ et al., 1993; PANAGOU et al., 2008).

Estes micro-organismos, resultantes de atividades competitivas entre uma microbiota variada, em virtude das suas atividades metabólicas, apresentam a característica de reduzir a possibilidade de deterioração dos frutos. Também contribui na preservação e melhoria das propriedades nutricionais, propiciando a elaboração de um produto alimentício mais saudável e de melhor sabor e aroma, além de possibilitar um maior valor comercial, aumento da vida de prateleira e segurança alimentar (RODRÍGUEZ et al., 2009; MEDINA et al., 2008; HAMMES, 1990; JIMENEZ DIAZ et al., 1993).

O processo de fermentação de azeitona é influenciado pela presença da microbiota espontânea, difusão de nutrientes de azeitona para a salmoura, nível de oleuropeína e outros compostos antimicrobianos, estágio de maturação, temperatura e concentração de sal que podem afetar o desenvolvimento da população bacteriana por estresse osmótico que mudam as propriedades estruturais da parede celular das bactérias (HURTADO et al., 2009). Assim, Quintana et al. (1997) relatam

a importância do conhecimento de todas as variáveis envolvidas no processo fermentativo, principalmente em relação às bactérias lácticas para a obtenção de um processo fermentativo homogêneo e de qualidade.

Tsapatsaris e Kotzekidou (2004) sugerem o uso do planejamento composto central rotacional e da metodologia de superfície de resposta com a finalidade de encontrar a melhor combinação das variáveis no processo para maximizar o crescimento de *L. plantarum* ATCC 8014 e *D. hansenii* durante o processo fermentativo de azeitonas.

O Delineamento de Experimentos (DOE) pode ser realizado de forma planejada, onde os fatores ou variáveis são alterados de modo a avaliar seu impacto sobre uma variável resposta. No caso de duas ou três variáveis independentes ou fatores o mais recomendado é um DCCR (CHAVES, 2008).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi empregar a metodologia de planejamento de experimentos para avaliar o processo de fermentação de azeitonas com cultura espontânea e *L. plantarum* em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e sacarose. As variáveis dependentes, pH, ácido láctico, açúcares redutores e bactérias lácticas foram monitoradas durante 120 dias de processamento.

## Material e Métodos

### Processamento das azeitonas

As azeitonas utilizadas neste estudo são da cultivar Grappolo, provenientes de plantas com cinco anos de idade, colhidas em março de 2012 na cidade de Pelotas-RS, quando atingiram uma cor verde uniforme. Elas foram classificadas e selecionadas de acordo com critérios de sanidade e dimensões médias de 2,36x1,75cm. Posteriormente, as azeitonas foram lavadas com água da tor-

neira para remover quaisquer impurezas e subsequentemente lixiviadas com hidróxido de sódio (NaOH) (1%, m/v) durante 7,5 h à temperatura ambiente. A difusão do NaOH foi monitorada por corte das azeitonas e aplicação de gotas de fenolftaleína (KAILIS e HARRIS, 2007) para verificar a difusão de 2/3 de NaOH na polpa até o núcleo (MEDINA et al., 2008). Após a lixiviação, as azeitonas foram imersas em um banho com água potável durante 15 min para remover o excesso de NaOH, na sequência adicionadas a uma solução de ácido acético 0,3% (v/v) durante 15 min a fim de neutralizar o restante de NaOH residual e atingir um pH próximo a 7.

### Fermentação das azeitonas

A solução de salmoura foi preparada empregando planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com diferentes concentrações de NaCl (2,4–13,6%) e sacarose (0–0,7%). Estas concentrações foram escolhidas com base em estudos anteriores realizados por Chammem et al., (2005), Bautista-Gallego et al., (2010), Fernández et al., (1997) e são semelhantes às concentrações normalmente utilizadas pela indústria (10%) (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2010). Além disso, Özyay e Borcakli (1995) mostraram que estes parâmetros são importantes para promover uma fermentação adequada.

O processo fermentativo foi realizado empregando cultura espontânea e *L. plantarum*.

No caso da fermentação espontânea, os frutos foram imediatamente submersos na salmoura para iniciar o processo fermentativo a qual se efetuou com a flora microbiana característica do fruto.

Para a fermentação com *L. plantarum* ATCC 8014, o inóculo foi preparado com culturas puras e liofilizadas fornecidas pela FIOCRUZ, devido à sua capacidade para degradar a oleuropeína (MARSILIO et al., 1996). Após a reativação da cultura, de acor-

do com as instruções do fabricante, a cultura foi adicionada ao meio seletivo com caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS). O caldo MRS foi suplementado com uma solução estéril de 4,5% de NaCl (Merck) (DE CASTRO et al., 2002) para adaptar a cultura em condições salinas. Esta solução foi incubada a 35°C *overnight*, até obtenção de massa celular de aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> (PANAGOUGOU et al., 2008). O meio foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Tsapatsaris e Kotzekidou (2004). Os volumes de inoculo com  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> utilizados nas fermentações foram definidos conforme descrito por Quintana (1999), Panagou et al., (2008), Chorianopoulos et al., (2005) e Tsapatsaris e Kotzekidou (2004).

A fermentação ocorreu em reatores de vidro tipo com capacidade de 800 g de azeitonas e 1,0 L de solução de salmoura, sendo acondicionados em temperatura ambiente e protegidos da luz durante 120 dias.

### Determinações analíticas

As amostras de salmoura foram recolhidas assepticamente em tubos estéreis e submetida à contagem de bactérias lácticas e análises físico-química nos tempos de 9, 20 e 120 dias, a fim de acompanhar as mudanças relacionadas com o processo de fermentação. O pH foi determinado usando um pHmetro (pHmetro, 016). A análise dos açúcares redutores foi realizada utilizando o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A concentração de ácido láctico (expresso como miligramas por 100 mL de solução salina ou salmoura) foi determinada através da acidez titulável com solução padronizada de 0,2 N de NaOH utilizando 1% de solução alcoólica de fenoltaleína como indicador (FERNANDEZ et al., 1997). As contagens bactérias lácticas foram realizadas utilizando a metodologia recomendado pela American Public Health

Association (APHA, 2001), com ágar MRS inoculadas em profundidade e com uma sobreposição do mesmo meio, incubada a 30°C durante 72 h.

### Análise estatística

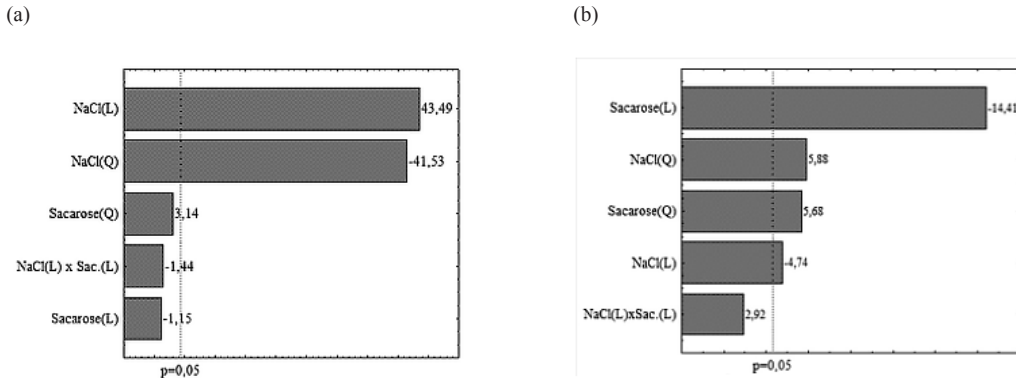
Os dados referentes às análises físico-químicas e contagem de bactérias lácticas, foram realizadas em triplicata, submetidos à avaliação estatística, empregando-se a análise de variância (ANOVA) através da metodologia de experimentos de DCCR e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey, utilizando o Software STATISTICA versão 8.0 (Stat Soft Inc®, USA) com nível de significância de 95%.

### Resultados

Na Tabela I e II são apresentados os valores de pH, ácido láctico, açúcares redutores e bactérias lácticas no processo de fermentação de azeitona com as culturas espontânea (S) e *L. plantarum* (L) no 9, 20 e 120° dias de fermentação.

O processo de fermentação mostrou uma diminuição nos valores de pH nas formulações em estudo, que, em, geral foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para ambas as culturas (Tabela I). O diagrama de Pareto (Figura 1(a)) demonstra que apenas a concentração de NaCl apresenta influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre pH no 9° dia da fermentação das azeitonas com a cultura espontânea, sendo o efeito linear positivo e o quadrático negativo. Na fermentação das azeitonas com a adição da cultura de *L. plantarum*, o diagrama de Pareto (Figura 1(b)) demonstra que a concentração de sacarose e NaCl apresentam influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no 20° dia da fermentação sendo o efeito lineares negativo e o quadrático positivo.

**Figura 1** - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados (valores absolutos) do teor de NaCl e Sacarose para pH da salmoura do 9º dia de fermentação das azeitonas com cultura espontânea (a) e 20º dia de fermentação das azeitonas com *L. plantarum* (b).



**Tabela I** - Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup> com valores codificados (reais) e respostas de pH (a) e ácido láctico (b) no 9º, 20º e 120º dias de fermentação com a cultura espontânea (S) e com a adição da cultura de *L. plantarum* (L) de azeitonas.

Variáveis Independentes			Variáveis Independentes						
			pH						
Ensaio	NaCl (%)	Sacarose (%)	9º dia	20º dia	120º dia	Ensaio	9º dia	20º dia	120º dia
S1	-1 (4)	-1 (0,1)	5,10 <sup>a</sup> ±0,02	5,10 <sup>a</sup> ±0,00	4,79 <sup>b</sup> ±0,00	L1	4,10 <sup>a</sup> ±0,01	4,23 <sup>b</sup> ±0,01	4,81 <sup>a</sup> ±0,02
S2	1 (12)	-1 (0,1)	5,23 <sup>b</sup> ±0,02	5,66 <sup>a</sup> ±0,01	4,93 <sup>c</sup> ±0,02	L2	5,12 <sup>a</sup> ±0,03	4,35 <sup>b</sup> ±0,01	4,25 <sup>c</sup> ±0,01
S3	-1 (4)	1 (0,7)	5,28 <sup>a</sup> ±0,02	5,05 <sup>b</sup> ±0,04	5,07 <sup>b</sup> ±0,02	L3	4,00 <sup>a</sup> ±0,01	3,66 <sup>b</sup> ±0,01	3,99 <sup>a</sup> ±0,02
S4	1 (12)	1 (0,7)	5,36 <sup>a</sup> ±0,04	5,23 <sup>b</sup> ±0,01	3,94 <sup>c</sup> ±0,00	L4	5,24 <sup>a</sup> ±0,02	4,29 <sup>b</sup> ±0,00	3,39 <sup>c</sup> ±0,02
S5	-1,41 (2,4)	0 (0,4)	4,03 <sup>c</sup> ±0,06	4,77 <sup>b</sup> ±0,01	5,63 <sup>a</sup> ±0,03	L5	4,00 <sup>a</sup> ±0,04	5,31 <sup>a</sup> ±0,02	5,07 <sup>b</sup> ±0,00
S6	1,41 (13,6)	0 (0,4)	5,39 <sup>a</sup> ±0,02	4,10 <sup>c</sup> ±0,00	4,41 <sup>b</sup> ±0,02	L6	5,08 <sup>a</sup> ±0,06	3,95 <sup>c</sup> ±0,00	4,29 <sup>b</sup> ±0,00
S7	0 (8)	-1,41 (0)	5,49 <sup>c</sup> ±0,02	5,93 <sup>a</sup> ±0,02	5,65 <sup>b</sup> ±0,01	L7	5,12 <sup>b</sup> ±0,03	5,65 <sup>a</sup> ±0,00	5,16 <sup>b</sup> ±0,01
S8	0 (8)	1,41 (0,8)	5,23 <sup>a</sup> ±0,02	4,16 <sup>c</sup> ±0,01	4,46 <sup>b</sup> ±0,04	L8	4,49 <sup>b</sup> ±0,03	3,58 <sup>c</sup> ±0,01	5,64 <sup>a</sup> ±0,01
S9	0 (8)	0 (0,4)	5,41 <sup>a</sup> ±0,01	4,80 <sup>b</sup> ±0,00	4,29 <sup>c</sup> ±0,02	L9	5,03 <sup>a</sup> ±0,05	3,85 <sup>c</sup> ±0,01	4,06 <sup>b</sup> ±0,01
S10	0 (8)	0 (0,4)	5,44 <sup>b</sup> ±0,03	3,79 <sup>c</sup> ±0,01	5,90 <sup>a</sup> ±0,01	L10	4,23 <sup>b</sup> ±0,02	3,99 <sup>c</sup> ±0,01	4,27 <sup>a</sup> ±0,02
S11	0 (8)	0 (0,4)	5,41 <sup>a</sup> ±0,01	4,32 <sup>b</sup> ±0,01	5,17 <sup>a,b</sup> ±0,01	L11	5,03 <sup>a</sup> ±0,05	4,01 <sup>b</sup> ±0,00	4,07 <sup>b</sup> ±0,02
<b>Ácido láctico (g.100 mL<sup>-1</sup>)</b>									
S1	-1 (4)	-1 (0,1)	0,19 <sup>c</sup> ±0,01	0,23 <sup>b</sup> ±0,01	0,27 <sup>a</sup> ±0,07	L1	0,23 <sup>a</sup> ±0,01	0,25 <sup>a</sup> ±0,01	0,25 <sup>a</sup> ±0,07
S2	1 (12)	-1 (0,1)	0,14 <sup>c</sup> ±0,03	0,27 <sup>a</sup> ±0,02	0,19 <sup>b</sup> ±0,05	L2	0,14 <sup>b</sup> ±0,04	0,28 <sup>a</sup> ±0,01	0,30 <sup>a</sup> ±0,07
S3	-1 (4)	1 (0,7)	0,22 <sup>b</sup> ±0,01	0,27 <sup>a</sup> ±0,0	0,25 <sup>a,b</sup> ±0,07	L3	0,21 <sup>c</sup> ±0,06	0,46 <sup>a</sup> ±0,04	0,30 <sup>b</sup> ±0,08
S4	1 (12)	1 (0,7)	0,10 <sup>c</sup> ±0,05	0,26 <sup>b</sup> ±0,02	0,34 <sup>a</sup> ±0,09	L4	0,13 <sup>c</sup> ±0,04	0,27 <sup>b</sup> ±0,04	0,39 <sup>a</sup> ±0,11
S5	-1,41 (2,4)	0 (0,4)	0,25 <sup>a</sup> ±0,00	0,27 <sup>a</sup> ±0,01	0,24 <sup>a</sup> ±0,07	L5	0,26 <sup>a</sup> ±0,03	0,17 <sup>b</sup> ±0,02	0,23 <sup>a</sup> ±0,06
S6	1,41 (13,6)	0 (0,4)	0,12 <sup>c</sup> ±0,05	0,28 <sup>a</sup> ±0,02	0,22 <sup>b</sup> ±0,06	L6	0,09 <sup>b</sup> ±0,06	0,31 <sup>a</sup> ±0,06	0,09 <sup>b</sup> ±0,03
S7	0 (8)	-1,41 (0)	0,09 <sup>b</sup> ±0,05	0,28 <sup>a</sup> ±0,00	0,26 <sup>a</sup> ±0,07	L7	0,14 <sup>b</sup> ±0,01	0,18 <sup>a</sup> ±0,02	0,12 <sup>b</sup> ±0,03
S8	0 (8)	1,41 (0,8)	0,14 <sup>b</sup> ±0,05	0,32 <sup>a</sup> ±0,00	0,31 <sup>a</sup> ±0,09	L8	0,13 <sup>b</sup> ±0,05	0,30 <sup>a</sup> ±0,05	0,14 <sup>b</sup> ±0,04
S9	0 (8)	0 (0,4)	0,12 <sup>c</sup> ±0,05	0,32 <sup>a</sup> ±0,05	0,17 <sup>b</sup> ±0,04	L9	0,12 <sup>c</sup> ±0,04	0,25 <sup>b</sup> ±0,00	0,34 <sup>a</sup> ±0,08
S10	0 (8)	0 (0,4)	0,12 <sup>c</sup> ±0,06	0,33 <sup>a</sup> ±0,07	0,17 <sup>b</sup> ±0,02	L10	0,12 <sup>c</sup> ±0,03	0,24 <sup>b</sup> ±0,06	0,31 <sup>a</sup> ±0,12
S11	0 (8)	0 (0,4)	0,11 <sup>c</sup> ±0,05	0,30 <sup>a</sup> ±0,03	0,20 <sup>b</sup> ±0,05	L11	0,11 <sup>c</sup> ±0,03	0,23 <sup>b</sup> ±0,01	0,28 <sup>a</sup> ±0,08

\*Médias ± desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de confiança (Teste de Tukey).

**Tabela II** - Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>2</sup> com valores codificados (reais) e respostas de açúcar redutor (c) e bactérias lácticas (d) no 9°, 20° e 120° dias de fermentação com a cultura espontânea (S) e com a adição da cultura de *L. plantarum* (L) de azeitonas.

Variáveis Independentes			Variáveis Independentes						
Ensaio	NaCl (%)	Sacarose (%)	Açúcar redutor (%)			Ensaio	9° dia	20° dia	120° dia
			9° dia	20° dia	120° dia				
S1	-1 (4)	-1 (0,1)	0,35 <sup>c</sup> ±0,00	0,84 <sup>b</sup> ±0,00	1,38 <sup>a</sup> ±0,05	L1	0,64 <sup>c</sup> ±0,00	0,86 <sup>b</sup> ±0,02	1,02 <sup>a</sup> ±0,02
S2	1 (12)	-1 (0,1)	1,19 <sup>b</sup> ±0,03	3,00 <sup>a</sup> ±0,05	1,13 <sup>b</sup> ±0,01	L2	1,85 <sup>a</sup> ±0,00	1,64 <sup>b</sup> ±0,08	0,99 <sup>a</sup> ±0,03
S3	-1 (4)	1 (0,7)	0,71 <sup>b</sup> ±0,00	1,11 <sup>a</sup> ±0,03	1,15 <sup>a</sup> ±0,01	L3	1,61 <sup>a</sup> ±0,00	0,96 <sup>c</sup> ±0,02	1,22 <sup>b</sup> ±0,01
S4	1 (12)	1 (0,7)	2,40 <sup>b</sup> ±0,04	10,0 <sup>a</sup> ±0,00	1,11 <sup>c</sup> ±0,01	L4	2,07 <sup>b</sup> ±0,02	9,54 <sup>a</sup> ±0,28	1,26 <sup>c</sup> ±0,03
S5	-1,41 (2,4)	0 (0,4)	1,27 <sup>a</sup> ±0,00	1,07 <sup>a</sup> ±0,12	1,21 <sup>a</sup> ±0,00	L5	0,71 <sup>b</sup> ±0,00	0,39 <sup>c</sup> ±0,01	1,07 <sup>a</sup> ±0,04
S6	1,41 (13,6)	0 (0,4)	4,86 <sup>b</sup> ±0,03	9,94 <sup>a</sup> ±0,05	1,76 <sup>c</sup> ±0,02	L6	1,03 <sup>c</sup> ±0,01	6,92 <sup>a</sup> ±0,02	1,46 <sup>b</sup> ±0,03
S7	0 (8)	-1,41 (0)	0,37 <sup>c</sup> ±0,01	1,71 <sup>a</sup> ±0,10	1,38 <sup>b</sup> ±0,01	L7	0,45 <sup>a</sup> ±0,02	0,49 <sup>a</sup> ±0,17	1,07 <sup>a</sup> ±0,07
S8	0 (8)	1,41 (0,8)	3,68 <sup>a</sup> ±0,02	1,43 <sup>b</sup> ±0,01	1,44 <sup>b</sup> ±0,03	L8	4,46 <sup>b</sup> ±0,01	9,95 <sup>a</sup> ±0,04	1,15 <sup>c</sup> ±0,06
S9	0 (8)	0 (0,4)	2,76 <sup>a</sup> ±0,01	1,51 <sup>b</sup> ±0,05	1,07 <sup>c</sup> ±0,04	L9	3,22 <sup>a</sup> ±0,02	0,96 <sup>c</sup> ±0,07	1,33 <sup>b</sup> ±0,03
S10	0 (8)	0 (0,4)	3,14 <sup>a</sup> ±0,03	1,13 <sup>c</sup> ±0,03	1,26 <sup>b</sup> ±0,03	L10	4,95 <sup>a</sup> ±0,03	0,81 <sup>c</sup> ±0,04	1,51 <sup>b</sup> ±0,07
S11	0 (8)	0 (0,4)	4,74 <sup>a</sup> ±0,03	0,53 <sup>c</sup> ±0,01	1,28 <sup>b</sup> ±0,03	L11	4,75 <sup>a</sup> ±0,04	0,34 <sup>a</sup> ±0,01	1,96 <sup>b</sup> ±0,09
Bactérias lácticas (log UFC mL <sup>-1</sup> )									
S1	-1 (4)	-1 (0,1)	5,14 <sup>c</sup> ±0,03	7,41 <sup>a</sup> ±0,05	5,88 <sup>b</sup> ±0,14	L1	7,46 <sup>a</sup> ±0,11	7,06 <sup>b</sup> ±0,08	6,55 <sup>c</sup> ±0,03
S2	1 (12)	-1 (0,1)	2,08 <sup>c</sup> ±0,00	4,95 <sup>b</sup> ±0,00	5,67 <sup>a</sup> ±0,03	L2	4,33 <sup>c</sup> ±0,05	7,02 <sup>a</sup> ±0,09	5,49 <sup>b</sup> ±0,01
S3	-1 (4)	1 (0,7)	5,90 <sup>c</sup> ±0,01	7,31 <sup>a</sup> ±0,07	6,24 <sup>b</sup> ±0,03	L3	7,47 <sup>a</sup> ±0,01	7,10 <sup>b</sup> ±0,11	6,17 <sup>c</sup> ±0,06
S4	1 (12)	1 (0,7)	2,51 <sup>c</sup> ±0,00	6,95 <sup>a</sup> ±0,04	5,11 <sup>b</sup> ±0,03	L4	4,66 <sup>b</sup> ±0,02	6,22 <sup>a</sup> ±0,16	4,63 <sup>b</sup> ±0,21
S5	-1,41 (2,4)	0 (0,4)	7,67 <sup>a</sup> ±0,08	7,09 <sup>b</sup> ±0,16	6,30 <sup>c</sup> ±0,08	L5	7,76 <sup>a</sup> ±0,10	7,10 <sup>b</sup> ±0,07	6,27 <sup>c</sup> ±0,03
S6	1,41 (13,6)	0 (0,4)	2,03 <sup>c</sup> ±0,00	7,56 <sup>a</sup> ±0,06	6,01 <sup>b</sup> ±0,15	L6	4,54 <sup>c</sup> ±0,12	7,49 <sup>a</sup> ±0,04	5,32 <sup>b</sup> ±0,05
S7	0 (8)	-1,41 (0)	4,14 <sup>c</sup> ±0,01	7,31 <sup>a</sup> ±0,04	5,75 <sup>b</sup> ±0,05	L7	7,07 <sup>a</sup> ±0,03	7,19 <sup>a</sup> ±0,13	4,44 <sup>b</sup> ±0,05
S8	0 (8)	1,41 (0,8)	6,04 <sup>b</sup> ±0,03	7,40 <sup>a</sup> ±0,03	5,32 <sup>c</sup> ±0,04	L8	7,36 <sup>a</sup> ±0,12	7,18 <sup>a</sup> ±0,16	5,79 <sup>b</sup> ±0,07
S9	0 (8)	0 (0,4)	3,25 <sup>c</sup> ±0,00	7,58 <sup>a</sup> ±0,01	6,05 <sup>b</sup> ±0,44	L9	6,01 <sup>b</sup> ±0,06	7,31 <sup>a</sup> ±0,12	5,82 <sup>b</sup> ±0,48
S10	0 (8)	0 (0,4)	5,55 <sup>b</sup> ±0,46	7,11 <sup>a</sup> ±0,48	5,40 <sup>b</sup> ±0,08	L10	6,98 <sup>b</sup> ±0,02	7,30 <sup>a</sup> ±0,00	5,75 <sup>c</sup> ±0,10
S11	0 (8)	0 (0,4)	3,80 <sup>c</sup> ±0,03	7,35 <sup>a</sup> ±0,05	6,03 <sup>b</sup> ±0,02	L11	6,29 <sup>b</sup> ±0,02	6,85 <sup>a</sup> ±0,00	6,33 <sup>b</sup> ±0,04

\*Médias ± desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de confiança (Teste de Tukey)

Os resultados obtidos para determinação do pH nos demais dias (20° e 120° dias de fermentação com a cultura espontânea e 9° dia com *L. plantarum*) indicam que a concentração de NaCl e sacarose não influenciam significativamente (p>0,05) na diminuição do pH, já para o 120° dia, com *L. plantarum*, a concentração de sacarose (Q) e NaCl(L) e

negativa apresentam influência estatisticamente significativa (p<0,05).

O ácido láctico na solução de salmoura aumentou com o tempo de fermentação e, em geral, até 20 dias em ambos os processos de fermentação, que apresentam diferenças significativas (p <0,05) (Tabela I).

Buscando verificar a influência do NaCl e da sacarose usados na formulação da salmoura, realizou-se a análise estatística dos resultados de ácido láctico no 9º dia de fermentação com a cultura espontânea e *L. plantarum* obtendo-se os modelos empíricos codificados de segunda ordem (Equação 1 e 2, respectivamente). Os modelos de segunda ordem foram validados pela análise de variância onde o valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi 6,85 e 4,26 vezes maior ao valor do  $F_{\text{tabelado}}$  para as culturas espontânea e *L. plantarum*, respectivamente, e coeficiente regressão de 0,97 para ambas as culturas, possibilitando construção das curvas de contorno apresentadas na Figura 2.

$$\text{Ácido láctico (\%)} = 0,119 - 0,044 \cdot \text{NaCl} + 0,037 \cdot (\text{NaCl})^2 - 0,017 \cdot \text{Sac} \cdot \text{NaCl} \quad (1)$$

$$\text{Ácido láctico (\%)} = 0,116 - 0,051 \cdot \text{NaCl} + 0,034 \cdot (\text{NaCl})^2 + 0,014 \cdot (\text{Sac})^2 \quad (2)$$

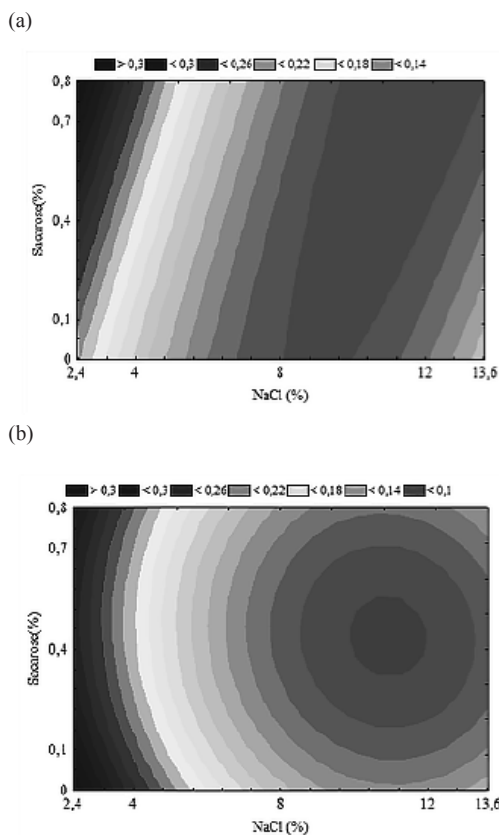
Os diagramas de Pareto (Figura 3(a e b)) demonstram que a concentração de sacarose (Q) e a interação entre a sacarose e o NaCl (L) apresentam influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) sobre ácido láctico nos respectivos dias e culturas: 120º e cultura espontânea e 20º dia e *L. plantarum*.

Os resultados obtidos para determinação de ácido láctico no 20 e 120 dias de fermentação de azeitonas respectivamente com a cultura espontânea e *L. plantarum* demonstram que a concentração de NaCl e sacarose não influenciam significativamente ( $p > 0,05$ ).

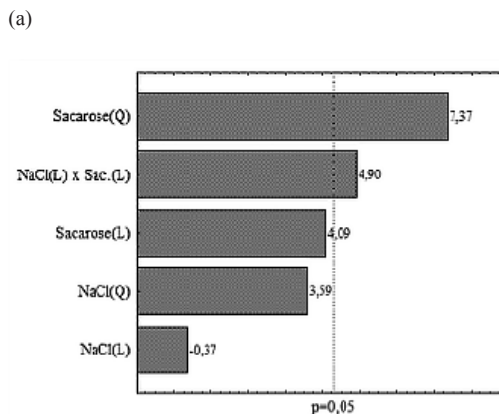
Ao analisar a Tabela II, foi possível observar, para ambas as culturas, que o maior teor de açúcares redutores disponíveis na salmoura foi observado aos 20 dias de fermentação em quase todos os tratamentos, após este período os teores diminuem.

A análise estatística resultou em um modelo empírico codificado de (Equação 3 e 4) para concentração de açúcares redutores

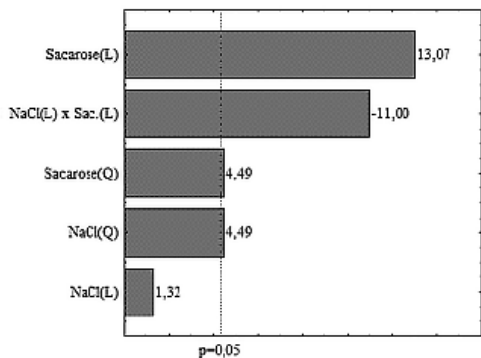
**Figura 2** – Curva de contorno para valores de ácido láctico ( $g \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  de salmoura) em função da concentração de NaCl (%) e sacarose (%) no 9º dia do processo fermentativo de azeitonas com cultura espontânea (a) e *L. plantarum* (b).



**Figura 3** - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados (valores absolutos) do teor de NaCl e Sacarose para ácido láctico da salmoura do 120º dia de fermentação das azeitonas com cultura espontânea (a) e 20º dia de fermentação das azeitonas com *L. plantarum* (b)



(b)



no 20° dia de fermentação de azeitonas com a cultura espontânea e *L. plantarum*, respectivamente. Os modelos foram validados pela análise de variância com coeficiente de regressão, 0,96 e  $F_{\text{calculado}}$  de 3,97 e 4,07 vezes o valor  $F_{\text{tabelado}}$  para a cultura espontânea e *L. plantarum*, respectivamente.

$$A.R\% = 1,341 + 2,953.NaCl + 0,0862.Sac + 2,195.(NaCl)^2 + 1,682.NaCl.Sac$$

$$A.R\% = 0,708 + 2,327.NaCl + 2,675.Sac + 1,177.(NaCl)^2 + 1,965.(Sac.)^2 + 1,950.NaCl.Sac$$

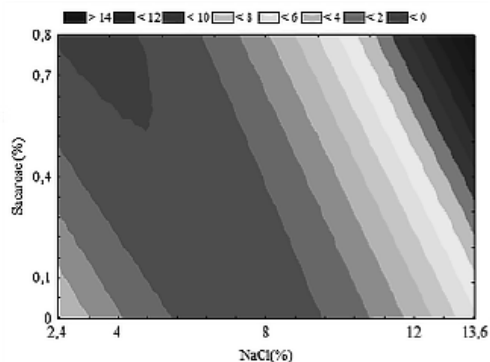
A análise de variância permitiu a validação dos modelos de segunda ordem e a construção das curvas de contorno apresentadas na Figura 4, onde é possível verificar que as maiores concentrações de NaCl e sacarose resultam em maiores teores de açúcares redutores no meio fermentativo aos 20 dias de fermentação.

Os resultados obtidos para determinação de açúcares redutores nos 9 e 120 dias de fermentação de azeitonas com a cultura espontânea e aos 120 dias com *L. plantarum*, indicaram que a concentração de NaCl e sacarose não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) nos teores de açúcares redutores da salmoura. Aos 9 dias, os resultados indicam que apenas a concentração de NaCl influen-

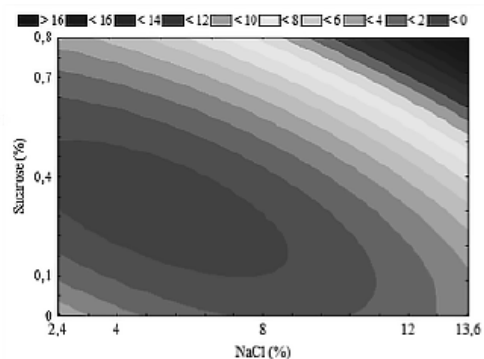
ciou significativamente ( $p < 0,05$ ) os teores de açúcares redutores a com cultura de *L. plantarum* (resultado não apresentado).

**Figura 4** – Curva de contorno para teores de açúcar redutor (%) em função da concentração de NaCl (%) e sacarose (%) utilizadas na salmoura no 20° dia do processo de fermentação das azeitonas com cultura espontânea (a) e *L. plantarum* (b).

(a)



(b)

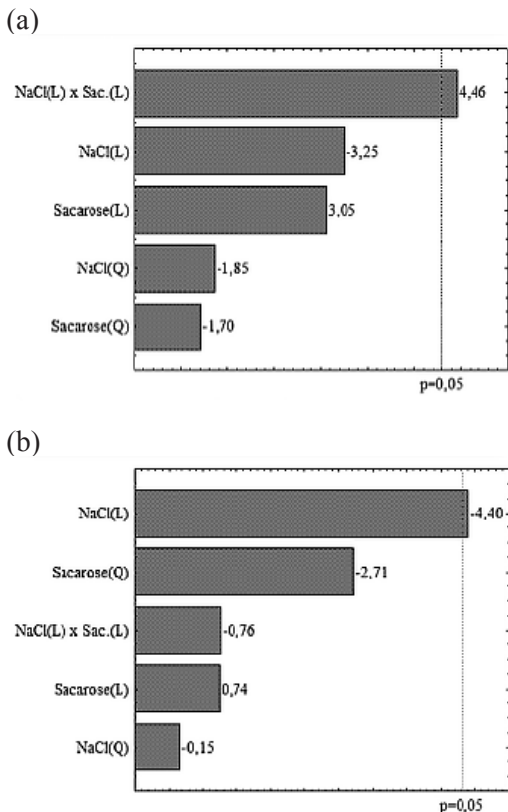


Comparando os resultados da contagem de bactérias lácticas da salmoura em cada tratamento do planejamento experimental fatorial  $2^2$ , no 9°, 20° e 120° dias de fermentação com a cultura espontânea e *L. plantarum* (Tabela II), verifica-se que todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para variável contagem de bactérias lácticas.

A Figura, a seguir, apresenta a análise dos efeitos estimados das variáveis pelo diagrama de Pareto em relação à contagem de bactérias lácticas na salmoura com a cultura espontânea



**Figura 5** - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados (valores absolutos) do teor de NaCl e Sacarose para contagem de bactérias lácticas na salmoura no 20º dia de fermentação das azeitonas com cultura espontânea (a) e 120º dia de fermentação das azeitonas com *L. plantarum* (b).



no 20º dia (Figura 5(a)) e *L. plantarum* aos 120 dias de fermentação (Figura 5(b)). Os dados analisados demonstram que a interação entre a concentração de NaCl e sacarose influenciam significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre a contagem de bactérias lácticas na cultura espontânea, já no *L. plantarum* o NaCl exerce efeito linear negativo sobre esta cultura.

Aos 9 e 120 dias de fermentação com a cultura espontânea e aos 9 e 20 dias com o *L. plantarum* verificou-se que a concentração de NaCl e sacarose não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) na contagem de bactérias lácticas para ambas fermentações.

## Discussão

Comparando os resultados da análise do pH da salmoura em cada tratamento do DCCR 2<sup>2</sup>, no 9º, 20º e 120º dias de fermentação com a cultura espontânea e *L. plantarum* (Tabela II), verifica-se que todos os tratamentos S1 e S2 apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si entre os dias avaliados para a variável pH, estes resultados estão de acordo aos obtidos por Chammem et al. (2005) e Sanchez et al. (2001) que preveem a diminuição do pH no decorrer da fermentação.

Como descrito pelo Codex Alimentarius STAN 66-1981 (Standard for Olives Table, 1987), as azeitonas fermentadas devem apresentar pH igual ou menor que 4,3. No presente estudo, os ensaios S4, S9 e L2, L3, L4, L6, L9, L10 e L11 (Tabela I) mostraram valores de pH menores e iguais a 4,3 atendendo aos padrões estabelecidos pelo Codex.

Torre et al. (1993) reiteram condições similares a este estudo, que até os 20 dias de fermentação apresentam uma queda do pH devido ao desenvolvimento de bactérias Gram-negativas que produzem dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético, ácido lático e etanol e posterior a isso, observa-se que o pH não apresenta variações expressivas, tendendo a estabilidade até ao final da fermentação.

Sanchez et al. (2001) relatam que o uso de elevadas concentrações de NaCl retardam a queda do pH e aumenta o tempo de fermentação e Chorianoopoulos et al. (2005) observaram em seu estudo uma maior queda do pH em ensaios o qual utilizou concentrações inferiores a 6% de NaCl, dados que corroboram com os resultados do presente estudo.

Avaliando os resultados de ácido lático na salmoura (Figura 2 (a e b)) verificou-se que os ensaios S4, S8, L2, L3, L4, L9 e L10 apresentam os níveis iguais ou acima do mínimo recomendado pelo Consejo Oleícola

Internacional (COI de 2004) na fase final de fermentação, ou seja, 0,3% de acidez livre expressa em ácido láctico.

Segundo Fernández et al. (1997), a taxa de produção de ácido láctico e o pH são aspectos importantes na elaboração de um produto final adequado, evitando a sua deterioração, sendo que a sua produção pode ser influenciada pelos teores de açúcares redutores disponíveis na salmoura e desenvolvimento de bactérias lácticas.

O comportamento no consumo dos açúcares redutores foi similar em ambos os processos fermentativos, onde concentrações menores de sacarose (0,1 - 0,4%) e níveis intermediários ou maiores de NaCl (8 - 13,6%) indicam a diminuição do consumo de açúcares na salmoura. De acordo com Özyay e Borcakli (1996), maiores teores de açúcares redutores são encontrados em formulação com concentração elevada de sal, por não haver o consumo de açúcares pela possibilidade de inibição do crescimento de micro-organismos nestas condições de fermentação.

Em relação a contagem de bactérias lácticas na salmoura, a Tabela II mostra que para 9º dia de fermentação com a adição da cultura de *L. plantarum* uma maior contagem de bactérias lácticas pode ser obtida em concentrações menores que 4% de NaCl e independente das concentrações de sacarose adicionada. Quintana et al. (1997) descreve que tanto o pH quanto a concentração de sal são fatores determinantes para o crescimento de bactérias lácticas. Segundo os autores,

quando é utilizada uma concentração de sal de 6%, ocorre uma inibição de 33% das bactérias, ao aumentar para 8% apenas 10% das bactérias sobrevivem. Estas informações corroboram com os resultados obtidos no presente estudo.

O processo de fermentação de azeitona é influenciado pela microbiota presente naturalmente no fruto, a difusão de nutrientes da azeitona para a salmoura, o nível de oleuropeína e outros compostos antimicrobianos. Além disso, o estágio de maturação, temperatura e concentração de sal também afetam o equilíbrio osmótico, alterando as propriedades estruturais da parede celular das bactérias, interferindo no processo fermentativo (HURTADO et al., 2012).

## Conclusão

Neste trabalho foi possível avaliar o processo de fermentação de azeitonas verdes pelo método espanhol, adicionando culturas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e cultura espontânea, empregando um DCCR, o qual permitiu concluir que em concentrações mais elevadas de sal ( $\geq 12,0\%$ ) da salmoura dificultaram o crescimento de bactérias do ácido láctico, impedindo o consumo de açúcares redutores. No entanto, em baixas concentrações de sal ( $4\% \leq$ ) favoreceram a diminuição do pH, o aumento da concentração de ácido láctico e o crescimento de bactéria lácticas, proporcionando uma condição mais adequada para o processo de fermentação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a URI, CAPES, CNPq, FAPERGS e IFC pela disponibilidade de infraestrutura e apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- American Public Health Association (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3 ed. Washington, p. 1219. 2001.
- BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 403-412. 2010.
- CHAMMEM, N. et al. Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p.1311-1316, 2005.
- CHAVES, A. T. C. A. **Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR)**. João Pessoa, 2008. 67 f. Dissertação Mestrado em Química - Universidade Federal da Paraíba.
- CHORIANOPOULOS, N.G. et al. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. **Food Microbiology**, Atena, Grécia, v. 22, n. 1, p. 117-124. 2005.
- CODEX ALIMENTARIUS. Stan 66-1981. **Norma del Codex para las aceitunas de mesa**. Standard for table olives, p. 1-18. 1981.
- CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL - COI. **Norma Comercial aplicable a lãs aceitunas de Mesa – Resolución nº RES-2/91-IV/04**. Madri, Espanha, 2004. Disponível em:< <http://www.internationaloliveoil.org/>>. Acesso em: 11 maio 2016.
- CORSETTI, A. et al. Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p. 248. 2012.
- DE CASTRO, A. et al. Utilization of *Enterococcus casseli flavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. **Food Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 637-644, 2002.
- FERNÁNDEZ, A. G.; DÍEZ, M. J. F.; ADAMS, M.R. **Table Olives: Production and Processing**. Chapman and Hall, London, 1997, 499p.
- HAMMES, Walter P. Bacterial starter cultures in food production. **Food Biotechnology**, v.4, n. 1, 383-397.1990.
- HURTADO, A. et al. Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 827-833. 2009.
- HURTADO, Albert et al. Lactic acid bacteria from fermented table olives. **Food Microbiology**, n.31, p.1 - 8. 2012.
- JIMENEZ DIAZ, R. et al. Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Seville, Espanha, v.59, n.5.1993.
- KAILIS, S.; HARRIS, D. **Producing Table Olives**. Landlinks. Australia, 2007.
- MARSILIO, V. et al. Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes. **Food Chemistry**, v.72, n.4, p. 485 - 490. 2001.
- MEDINA, E. et al. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. **Food Chemistry**, Seville, Espanha, v.110, n. 4, p.932-937. 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 31, p.426 - 428. 1959.

ÖZAY, GÜMER; BORCAKLI, MEHLIKA. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. **Food Research International**, v. 28, n. 6, p. 553-559. 1996.

PANAGOUE, E. Z. et al. Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, Atenas, Grécia, v.25, n. 2, p.348–358. 2008.

QUINTANA, M. C. D. et al. Bacterias del ácido láctico en la fermentación de aceitunas de mesa. **Grasas y Aceites**, v. 48. n. 5, p.297-311.1997.

RODRÍGUEZ, H. et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 79-90. 2009.

SANCHEZ, A. H. et al. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 115–122. 2001.

TORRE, J. E. et al. Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas. **Grasas y Aceites**, v.44, n. 4-5, p.4–5.1993.

TSAPATSARIS, S; KOTZEKIDOU, P. Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 157– 168. 2004.