



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**GLAUCIA APARECIDA MATAVELI FERREIRA**

**GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* POR ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

ALEGRE-ES

2013

GLAUCIA APARECIDA MATAVELI FERREIRA

**GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* POR ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. DSc. Raquel Vieira de Carvalho

Co-orientador: Prof. DSc. Wilmer Edgar Luera Peña

ALEGRE-ES

2013

---

Ferreira, Glaucia Aparecida Mataveli, 1978-

F383g      Germinação de esporos de *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* por alta pressão e temperaturas médias em suco de laranja integral. – 2013.

78 f. : il.

Orientador: Raquel Vieira de Carvalho.

Coorientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Suco de laranja – deterioração. 2. Germinação – esporos. 3. Alta pressão. 4. *Byssochlamys nivea*. 5. *Alicyclobacillus acidoterrestris*. I. Carvalho, Raquel Vieira de. II. Peña, Wilmer Edgard Luera. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 664

---

**GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* POR ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

**Glaucia Aparecida Mataveli Ferreira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 29 de agosto de 2013:

---

Prof<sup>a</sup> DSc. Elisabete Fantuzzi  
Universidade Federal do Espírito  
Santo (Membro Externo)

---

Prof<sup>a</sup>. DSc. Patrícia Campos  
Bernardes  
Universidade Federal do Espírito  
Santo (Membro Interno)

---

Prof<sup>a</sup> DSc. Raquel Vieira de  
Carvalho  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientadora)

Há ouro e abundância de rubis, mas os lábios do conhecimento são joia preciosa.

Provérbios 20:15

Dedico este trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para sua realização. Aos meus pais, ao meu marido e à minha filha dedico de forma especial.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Senhor da minha vida, pela oportunidade de vencer mais essa etapa.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES, pela concessão da bolsa e ao CNPQ pelo incentivo à pesquisa.

À minha orientadora Raquel e meu co-orientador Wilmer Edgar pela orientação e paciência.

Ao professor José Luis Passamai pela colaboração e pela sua amizade.

A meu esposo, Renato, pelo incentivo.

À minha filha, Renata, cujo mundo lúdico inerente a qualquer criança, proporcionou-me momentos únicos e fortalecedores.

À minha mãe, primeira a acreditar em minha capacidade, e por todas as vezes que ela não mediu esforços ao suprir minha ausência cuidando da minha filha.

Ao meu pai, meu exemplo de honestidade.

À minha tia Rosângela, que considero minha irmã, que também não mediu esforços para me ajudar.

Ao professor Dsc. José Augusto Sant'Ana pelo incentivo e ajuda.

Ao professor Alcélvio Monteiro pela ajuda.

À minha irmã Perina, ao meu cunhado Gilberto e aos meus queridos sobrinhos: Natã, Helena e Estêvão.

À minha cunhada Adriana e ao concunhado Júnior e aos meus queridos sobrinhos: Mateus, Daniel e Thalita.

À minha cunhada Marcela e ao concunhado Leonardo.

À minha sogra Penha e ao meu sogro Aylton. E a tantos outros presentes em oração.

Às grandes amigadas: Amanda, Lorane Figueiró e Nayara Benedito.

À colaboração de Poliana Bergamin.

À banca pelas considerações e colaborações.

Muito Obrigada!



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da ativação e germinação de ascósporos. Fonte: EICHER e LUDWIG (2002), modificado.....	13
Figura 2	Esquema de ativação e germinação de esporos de bactéria baseado em estudos com o gênero <i>Bacillus</i> . Fonte: SETLOW, 2003, (modificado).....	15
Figura 3	<i>Byssochlamys nivea</i> (d) Conidióforos; (e) conídios; (f) ascósporos. FONTE: SAMSON et al., 2009 (modificado).....	17
Figura 4	Fluxograma das etapas da metodologia.....	43
Figura 5	Representação esquemática da célula de pressão.....	44
Figura 6	Esporos livres de <i>Byssochlamys nivea</i> corados com lactofucsina, observados em microscópio ótico, objetiva de 100x.....	47
Figura 7	Gráfico de Pareto para efeitos lineares e quadráticos de pressão, temperatura e tempo e as respectivas interações sobre a germinação dos esporos de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de laranja.....	49
Figura 8	Gráfico de superfície de resposta do log de N (germinação) de ascósporos de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de laranja em relação à temperatura (°C) e a pressão (MPa).....	50
Figura 9	Fluxograma das etapas da metodologia.....	64
Figura 10	Representação esquemática da célula de pressão.....	65
Figura 11	Esporos <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DMS 2498 corados com verde malaquita, observados em microscópio ótico, objetiva de 100x.....	68
Figura 12	Gráfico de Pareto para efeitos lineares e quadráticos de pressão, temperatura e tempo e suas respectivas interação sobre a germinação dos endósporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em suco de laranja.....	70
Figura 13	Gráfico de superfície de resposta do log de N, germinação de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja.....	72
Figura 14	Gráfico da curva de nível do log de N, germinação de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	PIQ do suco de laranja de acordo com a Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000 do MAPA.....	5
Tabela 2	Valor D para <i>Byssochlamys nivea</i> em diferentes temperaturas e substratos.....	19
Tabela 3	Espécies de <i>Alicyclobacillus</i> primeiramente identificadas em alimentos.....	20
Tabela 4	Valores utilizados no DCCR para três variáveis independentes.....	41
Tabela 5	Valores codificados e reais da temperatura, pressão e tempo..	42
Tabela 6	Análises físico-químicas do suco de laranja variedade Pera.....	46
Tabela 7	Tratamentos, níveis das variáveis independentes (temperatura, pressão, tempo) e número de esporos germinados (log esporos.mL-1) de <i>B. nivea</i> no suco de laranja após os tratamentos .....	48
Tabela 8	Coeficientes da regressão e modelo polinomial para germinação de ascósporos de <i>Byssochlamys nivea</i> .....	49
Tabela 9	Valores utilizados no DCCR para três variáveis independentes.....	62
Tabela 10	Valores codificados e reais da temperatura, pressão e tempo..	63
Tabela 11	Análises físico-químicas do suco de laranja variedade Pera.....	67
Tabela 12	Tratamentos, níveis das variáveis independentes (temperatura, pressão, tempo) e número de esporos germinados (log esporos.mL-1) de <i>A. acidoterrestris</i> no suco de laranja após os tratamentos .....	69
Tabela 13	Coeficientes da regressão para germinação de endósporos de <i>A. acidoterrestris</i> .....	70

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. LARANJA.....	3
2.3. MICROBIOLOGIA DE SUCO.....	5
2.4. PROCESSAMENTO DE SUCOS.....	6
2.5. ALTA PRESSÃO EM ALIMENTOS.....	7
2.7. ESPOROS.....	11
2.8. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS.....	12
2.9. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS.....	15
2.10. <i>Byssochlamys nivea</i> .....	17
2.10.1. Termorresistência e barorresistência.....	18
2.11. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	20
2.11.1. Termorresistência e barorresistência.....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

### CAPÍTULO I

#### INDUÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* POR ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL

RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODO.....	39
2.1. SUCO DA LARANJA.....	39
2.1.1. Obtenção.....	39
2.1.2. Análises físico-químicas.....	39
2.1.2.1. Determinação de sólidos solúveis totais (SST).....	39
2.1.2.2. Avaliação do pH.....	39
2.1.2.3. Acidez total titulável.....	39
2.1.2.4. Cálculo do Ratio.....	40
2.2. <i>Byssochlamys nivea</i> .....	40
2.2.1. Cepa utilizada e meios para cultivo e quantificação.....	40
2.2.2. Produção da suspensão de esporos.....	41
2.2.3. Preparo dos esporos de <i>Byssochlamys nivea</i> .....	42
2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
2.4. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	43
2.4.1. Fluxograma de trabalho.....	43
2.4.2. Preparo do inóculo.....	44
2.4.3. Pré-Tratamento Térmico.....	44
2.4.4. Tratamento por Alta Pressão.....	45
2.4.4.1. A célula de Alta Pressão.....	45
2.4.4.2. Pressurização do suco.....	46
2.5. CONTAGEM FINAL DOS ESPOROS NO SUCO PROCESSADO.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46

3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SUCO DE LARANJA.....	46
3.2. OBSERVAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Byssochlamys nivea</i> .....	47
3.3. EFEITO DOS TRATAMENTOS NA GERMINAÇÃO ESPOROS DE <i>Byssochlamys nivea</i> .....	48
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITO DA ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

<b>RESUMO</b> .....	58
<b>ABSTRACT</b> .....	59
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	60
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	61
2.1. SUCO DA LARANJA.....	61
<b>2.1.1. Obtenção</b> .....	61
<b>2.1.2. Análises físico-químicas</b> .....	61
2.1.2.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (SST).....	61
2.1.2.2. Avaliação do pH .....	61
2.1.2.3. Acidez total titulável.....	61
2.1.2.4. Cálculo do Ratio .....	62
2.2. PREPARO DE ESPOROS DE <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	62
<b>2.2.1. Cepa utilizada e meios de cultivo e de quantificação</b> .....	62
<b>2.2.2. Produção da suspensão de esporos</b> .....	63
<b>2.2.3. Preparo dos esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i></b> .....	64
2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	64
2.4. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	65
<b>2.4.1. Fluxograma de trabalho</b> .....	66
<b>2.4.2. Preparo do inóculo</b> .....	66
<b>2.4.3. Pré-Tratamento Térmico</b> .....	67
<b>2.4.4. Tratamento por Alta Pressão</b> .....	67
2.4.4.1. A célula de Alta Pressão.....	67
2.4.4.2. Pressurização do suco .....	68
2.5. CONTAGEM FINAL DOS ESPOROS NO SUCO PROCESSADO .....	68
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	69
3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SUCO DE LARANJA.....	69
3.2. OBSERVAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> . ...	70
3.3. EFEITO DA PRESSÃO E DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	71
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	75
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	76
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	78

## RESUMO

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Germinação de esporos de *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* por alta pressão e temperaturas médias em suco de laranja integral. 2013.** Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo Alegre, ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Vieira de Carvalho. Co-orientador: Prof. Dr. Wilmer Edgar Luera Peña.

*Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* são micro-organismos deterioradores de grande importância para a indústria de suco de frutas, por serem capazes de produzir esporos que por sua vez suportam os tratamentos térmicos, normalmente utilizados na pasteurização de sucos. Esses esporos podem ser ativados pelo calor antecipando a deterioração desses alimentos e causando grandes prejuízos à indústria de suco de frutas. Assim, a busca por novas estratégias para minimizar esses problemas tem sido objeto de pesquisa. O estudo da associação entre tecnologias térmicas e não térmicas vem se destacando, na tentativa de controlar ou inibir a presença desses micro-organismos. Uma das estratégias é a inativação dos micro-organismos em duas etapas. Na primeira, um pré-tratamento visa sensibilizar os micro-organismos por meio de ativação da germinação. Na segunda etapa, o tratamento teria como objetivo inativar os micro-organismos sensibilizados. Neste estudo, utilizou-se a combinação de temperatura seguido de alta pressão, a fim de testar o comportamento de esporos de *B. nivea* e *A. acidoterrestris*. As temperaturas variaram de 46,6-63,4 °C durante vinte minutos, seguidos de alta pressão que variaram entre 300 e 500 MPa, por tempos de 5 a 15 minutos, constituindo o delineamento composto central rotacional (DCCR). Para a germinação de *B. nivea*, o fator mais significativo ( $p < 0,05$ ) foi a alta pressão. Quanto mais alta a pressão, maior a germinação, atingindo um nível máximo a 500 MPa. Para a germinação de esporos de *A. acidoterrestris*, a temperatura foi o fator mais significativo ( $p < 0,05$ ), seguindo a tendência de quanto mais elevada a temperatura, maior a germinação dos esporos.

Palavras-chave: Esporos, *Byssochlamys nivea*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* germinação, alta pressão, deterioração, suco de laranja.

## ABSTRACT

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Germination of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Byssochlamys nivea* for high pressure average temperatures in orange whole juice. 2013.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology) Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Vieira de Carvalho. Coadvisor: Prof. Dr. Wilmer Edgar Luera Peña.

*Byssochlamys nivea* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* are spoilage microorganisms of great importance to the juice industry, they are able to produce spores. In addition to supporting the heat treatment commonly used in pasteurization of juices, these spores can also be activated by heat anticipating the deterioration of these foods and causing major damage to the fruit juice industry. New technologies have emerged for food processing. One is the use of high pressure. However, even with this technology, these microorganisms are difficult to control. Therefore, new strategies have been search to minimize these problems. One of such strategy is the inactivation of these microorganismos in two steps. First, a pre-treatment aims to sensitize the microorganisms through activation of germination. . In the second stage, the treatment would aim to inactivate microorganisms sensitized. However, data are needed to describe the levels of temperature and pressure necessary to sensitize these microorganisms. In this study, we used a combination of temperature followed by high pressure in order to test the behavior of *B. nivea* and *A.acidoterrestris* spores. Temperatures ranging from 46.6 to 63.4 °C for twenty minutes, followed by high-pressure ranging between 300 and 500 MPa for 5 to 15 minutes constituted the central composite rotational design (CCRD). For germination of *B. nivea*, the most significant factor ( $p<0.05$ ) was high pressure, higher the pressure, greater the germination, reaching a maximum at 500 MPa. For germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, temperature was the most significant factor ( $p<0.05$ ), following the trend of higher the temperature, higher the germination of spores.

Keywords: Spores, *Byssochlamys nivea*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* germination, high pressure, deterioration, orange juice.

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos à base de frutas têm alta concentração de sólidos solúveis (65-80 °Brix), presença de ácidos orgânicos, atividade de água e pH reduzidos que são fatores inibidores para o crescimento de muitos micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhi, *Shigella*, *Clostridium* e vírus da hepatite A (FELLERS, 1992). Porém, a maioria dos produtos e bebidas à base de frutas ainda são suscetíveis ao crescimento de leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido lácticas, devido a sua capacidade de crescerem em ambientes muito ácidos (pH<4,0) (EIROA et al, 1999).

A fim de aumentar a vida de prateleira, de alimentos, como exemplo os sucos de frutas, contra a deterioração, principalmente, de micro-organismos acidófilos utiliza-se o processo de pasteurização que é geralmente suficiente para destruí-los tornando-os produtos comercialmente esterilizados (HARRICHANDPARSAD, 2007).

Espécies de fungos e bactérias, tais como *Byssochlamys nivea* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* são capazes de formar esporos e de sobreviver aos tradicionais tratamentos de pasteurização (GRESSONI, 2002; WALLS e CHUYATE, 2000).

*Byssochlamys nivea* é um fungo termorresistente, acidófilo, capaz de sobreviver a altas temperaturas por meio dos seus ascósporos e crescer em valores de pH inferiores a 4,0. Além disso, têm importância na segurança de alimentos, pois é capaz de produzir a patulina, que é uma toxina termorresistente que exibe potencial teratogênico e neurotóxico (MASSAGUER, 2005).

Já *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria termorresistente acidófila, formadora de esporos, capaz de sobreviver a temperaturas de 95 °C até 2 minutos e de crescer dentro de uma faixa de pH de 2,5-6,0 (DUVENAGE, 2006).

A inativação desses tipos de micro-organismos tanto por alta pressão quanto pelo calor é difícil. Porém, pesquisas demonstram que essa inativação pode ser facilitado quando é realizado em duas etapas. Na primeira, um

tratamento é dado a fim de levar os esporos à ativação da germinação, e na segunda, um tratamento para inativar os micro-organismos sensibilizados (FERREIRA et al., 2009; EICHER e LUDWIG, 2002).

A vantagem desse processamento em duas ou mais etapas é que ele provoca uma carga térmica muito mais baixa no produto preservando suas características sensoriais em comparação com um processo puramente térmico (VERCAMMEN et al., 2012).

Para utilizar essa estratégia de inativação de esporos é necessário conhecer o intervalo que leva a ativação da germinação dos esporos. Esse intervalo ou janela de ativação da germinação é entendido como uma faixa de tratamento seja térmico, não térmico, físico ou químico que leva à quebra de dormência dos esporos diminuindo a sua resistência inerente. Os valores limites dessa faixa podem variar de um micro-organismo para outro (AOUADHI et al., 2012; EICHER e LUDWIG, 2002).

Em particular, pouco se sabe sobre a ativação e germinação de esporos induzidas por alta pressão sob diferentes condições de temperatura. Esta é uma questão relevante porque a inativação de esporos por alta pressão à temperatura moderada é dependente desse evento (WUYTACK e MICHIELS, 2001).

Assim o presente estudo teve como objetivo testar a capacidade de germinação dos esporos de *Byssochlamys nivea* e de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja sob temperaturas que variaram de 43,6 °C a 64,3 °C por 20 minutos seguidas de alta pressão de 300 MPa a 500 MPa por tempos de retenção que variaram de 5 a 15 minutos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. LARANJA

Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2010), a fruticultura brasileira vem se ampliando nos últimos dez anos e ganhando cada vez mais importância na economia do país. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, ficando atrás apenas da China e da Índia, sendo que, cerca de 50%, dessa produção é destinada ao mercado de frutas processadas e 47% ao mercado de frutas frescas.

Segundo Borges e Toledo (1999), a partir da década de 80, a citricultura brasileira foi vista como uma atividade crescente e dinâmica, apresentando um movimento contrário à situação recessiva do país no período. Segundo os mesmos autores, essa situação apresentada pela citricultura deveu-se, em grande parte, às geadas sucessivas ocorridas, naquela década, nos pomares norte-americanos, o que proporcionou uma posição de quase monopólio do Brasil no comércio internacional de suco de laranja.

O cultivo de laranja no Brasil se divide em dois períodos distintos. O primeiro, de 1990 a 1999, caracteriza-se pelo aumento da produção e conquista da posição de líder do setor. O segundo, a partir de 1999, é o período de consolidação da capacidade e desempenho produtivo. São colhidas, anualmente, no país, mais de 18 milhões de toneladas de laranja ou cerca de 30 % da safra mundial da fruta (MAPA, 2012).

No estado do Espírito Santo, a citricultura já foi destaque em décadas passadas. Com o objetivo de contribuir para revitalizar e expandir a cultura da laranja em Jerônimo Monteiro, tradicional produtor da fruta no estado do Espírito Santo, a Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG), por meio do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF), junto com a Prefeitura local, a Embrapa Transferência de Tecnologia e o Programa Mais Alimentos, do Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), promovem ações que estão sendo implementadas e são específicas para a cultura no município (IBRAF, 2009).

## 2.2. SUCO DE LARANJA

De acordo com o decreto nº 6.871 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), suco ou sumo é a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2009).

O suco não poderá conter substâncias estranhas à fruta ou parte do vegetal de sua origem, excetuadas as previstas na legislação específica na Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000 do MAPA, que regulamenta sobre os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) para polpa de fruta (BRASIL, 2000).

De acordo com o MAPA, a lei nº 8.918 de 14 de junho de 1994 que regulamenta sobre a padronização, classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, a designação "integral" será privativa do suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural, sendo vedado o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 1994).

Ainda de acordo com o MAPA cuja Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000, que estabelece os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de sucos, dentre eles o de laranja, define: o suco de laranja deverá obedecer às características de cor: amarelo, sabor: próprio, aroma: próprio (BRASIL, 2000).

Os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) estabelecidos pelo MAPA são importantes ferramentas no controle da qualidade das bebidas de laranja produzidas no Brasil (FIGUEIRA et al., 2010). Os PIQ, apresentados na Tabela 1 estão especificados de acordo a Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000 do MAPA (BRASIL, 2000).

Tabela 1. PIQ do suco de laranja de acordo com a Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000 do MAPA

	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis em °Brix a 20°C	10,5	-
Relação de sólidos solúveis em BRIX/acidez em g/100g de ácido cítrico anidro	7,0	-
Ácido ascórbico (mg/100mg)	25,00	-
Açúcares totais naturais da laranja (g/100g)	-	13,00
Óleo essencial de laranja %v/v	-	0,035

Fonte: Brasil, 2000

### 2.3. MICROBIOLOGIA DE SUCO

De acordo com a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde, que estabelece critérios e padrões microbiológicos para alimentos, mostra que sucos “in natura” deverão ter o limite de 100 coliformes 45 °C/mL e ausência de *Salmonella* em 25 mL de amostra (BRASIL, 2001). A Instrução Normativa nº 01 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento regulamenta Padrões de Identidade e de Qualidade para polpa de fruta e estabelece limite de  $5,0 \times 10^3$  UFC ou NPM/g de suco integral para bolores e leveduras, 1,0 UFC ou NPM/g de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* em 25g (BRASIL, 2000).

A deterioração microbiana é a maior causa da perda de qualidade em alimentos e bebidas (SPRINGETT, 1996).

Os sucos de frutas fornecem proteção natural contra a proliferação da maioria dos micro-organismos por terem pH ácido. Mas alguns micro-organismos ainda podem crescer nessa faixa de pH, destacando-se os fungos, leveduras e as espécies de bactérias *Lactobacillus* (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

De acordo com Eguchi et al. (2001) os sucos de frutas são meios propícios para o desenvolvimento de bactérias e fungos acidófilos capazes de produzir esporos. Segundo os mesmos autores, esses micro-organismos, ao sobreviverem aos tratamentos térmicos aplicados, crescem ainda sob condições de baixos valores de pH. Tais micro-organismos deterioram o produto pela degradação de alguns compostos como carboidratos, proteínas e vitaminas, produzindo odores e sabores indesejáveis e alterações na cor, pH e textura do produto final, trazendo prejuízos a indústria de alimentos. Além disso, seus metabólitos podem ser tóxicos e oferecerem riscos à saúde do consumidor.

Bactérias patogênicas, geralmente não são capazes de se desenvolverem nos valores de pH inferiores a 4,0 (TETRA PAK, 2009; FELLERS, 1992). No entanto, existem estudos que mostram a capacidade de tolerância de alguns micro-organismos como *Escherichia coli* O157:H7 em sucos de frutas (RYU e BEUCHAT, 1998).

## 2.4. PROCESSAMENTO DE SUCOS

O suco de laranja concentrado e congelado é o grande responsável pelo sucesso da bebida no mundo. Grande parte da água é retirada da bebida por processos utilizando evaporadores. O processo de concentração inativa os micro-organismos responsáveis pela degradação do líquido. Ao fim deste primeiro estágio, um produto que entrou com níveis de açúcares totais de 10 a 11 °Brix (sólidos solúveis) termina com um teor de 66 °Brix - padrão do suco de laranja concentrado congelado. Em seguida, vai para tanques de armazenamento e congelamento, onde pode ser estocado por um período de até dois anos (CITRUS BR, 2012).

O suco de laranja natural apresenta uma vida útil muito limitada, cerca de 1 a 2 dias, de 8 a 10 °C. O processamento térmico visa aumentar a sua vida útil e garantir a saúde do consumidor, porém deve ser conduzido de forma a manter as características sensoriais mais próximas do suco natural "fresco", seguindo a tendência de preferência do consumidor, em especial do brasileiro, a quem o suco de laranja natural é acessível (CORRÊA NETO e FARIA, 1999; ALVES e GARCIA, 1993). Isso porque há tendência à diminuição dos atributos

de aroma e sabor de laranja natural com a elevação do tempo de retenção no processo de pasteurização (DELLA TORRE et al., 2003).

O processo de pasteurização é realizado principalmente para inativar enzimas que podem hidrolisar a pectina, uma goma natural que ajuda a manter as partículas do suco em suspensão (TETRA PAK, 2009).

## 2.5. ALTA PRESSÃO EM ALIMENTOS

De acordo com Rivalain et al. (2010) podem-se considerar dois tipos de pressões empregadas em tratamentos de alimentos: a pressão estática e a pressão dinâmica. A pressão estática é assim definida quando um valor de pressão é mantido por um tempo definido (tempo de espera ou de retenção). Esta, por sua vez, pode ser isostática e não isostática. Será isostática quando o mesmo valor de pressão é aplicado em todas as direções do espaço. E quando há gradiente de pressão ao longo da matéria (alimento) é definida como não isostática. Este último pode ocorrer devido à própria estrutura do equipamento ou à característica anisotrópica pronunciada do material a ser pressurizado (um sistema sólido, por exemplo). Ainda foi relatado pelos mesmos autores, que a pressão dinâmica consiste no uso de pressões altas por curto espaço de tempo, ou seja, ondas ou pulsos de alta pressão são usados para gerar esse tipo de processamento.

O processamento por alta pressão (AP), aplicado para a conservação de alimentos, apesar de ser considerado emergente, foi testado pela primeira vez em 1899, por Hite, para a inativação de bactérias deterioradoras em leite usando uma prensa hidráulica (TRIBST et al., 2008).

Os avanços obtidos na indústria de cerâmica e metalúrgica no uso de técnicas de AP, durante os anos 1970 e 1980 (TRUJILLO et al., 2002), possibilitaram a expansão dessa tecnologia para outras áreas, incluindo a indústria de alimentos (KNNOR, 1995).

Rivalain et al. (2010) descrevem que ao longo do período 1910-1955, duas equipes principais de pesquisa (Bridgman nos EUA e Basset na França) focaram seus trabalhos nessa nova área de pesquisa, contribuindo para o seu desenvolvimento. De acordo com os mesmos autores, depois de um longo período, durante o qual o emprego da alta pressão havia sido utilizado,

principalmente em outros domínios, (Geologia, Geoquímica, Química e Física) a partir dos anos de 1980-1990 o processo de alta pressão foi redescoberto, em particular, para processamento de alimentos, no Japão.

Assim, a AP atraiu a atenção da indústria de alimentos inicialmente no Japão (SUZUKI, 2002). O primeiro vaso de pressão para processamento de alimentos foi desenvolvido pela Mitsubish Heavy Industries Ltda, em Tóquio. E os primeiros produtos comerciais tratados por AP apareceram no mercado japonês em 1991, em que o processamento por AP foi utilizado para produtos como sucos de frutas, compotas, molhos, arroz, bolos e sobremesas (TRUJILLO et al. 2002).

O processamento por AP vem atraindo a atenção da indústria de alimentos em todo mundo (SUZUKI, 2002). Na Europa, são comercializados fatias de presunto cozido (España, Espanha), e suco de laranja (Pampryl, França) nos supermercados. Em geral, estes produtos são alimentos relativamente ácidos, tais como sucos de frutas, que são pressurizados para inativar bactérias, fungos e leveduras (TRUJILLO et al., 2002).

A alta capacidade da tecnologia por AP para inativar micro-organismos em temperatura ambiente, o torna uma das melhores alternativas aos tratamentos térmicos. E, dada a tendência de crescimento da preferência do consumidor por produtos frescos, livre de aditivos e microbiologicamente seguros, o uso da AP desponta como uma das tecnologias emergentes mais promissoras nos vários setores de processamento de alimentos, uma vez que, os componentes dos alimentos responsáveis pelo valor nutritivo e propriedades sensoriais, dependendo dos níveis de pressão utilizados, não são afetados (KREŠIĆ et al., 2011; DELIZA et al., 2006).

Em contraste com o tratamento térmico, no processamento por AP, a transferência de pressão é uniforme e quase instantânea sobre toda a massa do alimento, independente da sua forma e tamanho (BALASUBRAMANIAN et al., 2004; KNNOR, 1995), ou seja, o tempo do processo de pressurização é, portanto, independente do tamanho da amostra (BLACK et al., 2007b).

De acordo com Cheftel (1992), os tratamentos térmicos afetam ligações covalentes bem como não covalentes, já o tratamento por AP, dentro de temperaturas amenas, afeta somente ligações químicas relativamente fracas

como ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações iônicas. Assim, moléculas pequenas, tais como vitaminas, aminoácidos, açúcares simples e compostos relacionados com sabor não são afetados pelo tratamento por AP.

## 2.6. EFEITO DO PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO NOS MICRO-ORGANISMOS

Aplicada à segurança de alimentos, o objetivo principal do processamento por alta pressão (AP) é alcançar a inativação de micro-organismos presentes em alimentos, preservando suas propriedades sensoriais (RIVALAIN et al., 2010).

A maioria das alterações induzidas por alta pressão a macromoléculas são reversíveis até 200 MPa (MENTRÈ e HOA, 2001).

De acordo com Rivalain et al. (2010), o efeito da AP no interior de sistemas biológicos foi primeiramente investigado por Regnard em 1884. Os mesmos autores descrevem que, em Biociências, as investigações focaram principalmente, em: 1) a descoberta dos *piezophile* (ou barófilos), micro-organismos localizados em ambientes como fundo do mar, com os estudos envolvendo a pressão e adaptação, em particular, o papel de AP na origem da vida, 2) a inativação de micro-organismos em produtos alimentícios e: 3) as investigações relacionadas com os efeitos de alta pressão em sistemas biológicos e seus constituintes.

Várias estruturas e reações bioquímicas, que fazem parte do funcionamento da célula, podem ser muito sensíveis à pressão, como a função estrutural da proteína para a integridade da membrana celular, resultando na incapacidade de sobrevivência do micro-organismo (TING et al., 2002). De acordo com Winter e Jeworrek (2009), devido à sensibilidade de lípidos à pressão, estes componentes biológicos são muitas vezes considerados como o principal alvo da pressão na inativação de micro-organismos. Hoover et al. (1989), consideraram a desnaturação de enzimas essenciais como principal mecanismo de inativação das células, além de colapso de vacúolos, perda de mobilidade, separação de citoplasma e membrana celular.

Segundo Torres e Velasquez (2004), o processamento por AP é capaz de inativar micro-organismos patogênicos e deterioradores à temperatura ambiente, média e baixa. Como preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o processamento por alta pressão deve ser capaz de produzir 5 reduções decimais em micro-organismos patogênicos, incluindo *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* (AN et al., 2000; STEWART et al. 1997; PATTERSON, et al., 1995; MACKEY et al. 1994; STYLES et al., 1991; METRICK et al. 1989).

Sabe-se que a fluidez da membrana diminui quando a pressão aumenta, assim, micro-organismos com membranas menos fluidas são mais sensíveis à pressão (YALDAGARD et al., 2008). Além disso, estas observações poderiam estar associadas a alterações das propriedades da membrana, tais como a desnaturação de proteínas ligadas à membrana (PILAVTEPE-ÇELIK et al., 2009).

Segundo Winter e Jeworrek (2009), os micro-organismos barofílicos, por sua vez, são capazes de se adaptarem e crescerem em ambientes onde as pressões podem ser maiores que 100 MPa. Uma das adaptações que permite a sobrevivência desses organismos são as membranas plasmáticas mais fluidas devido à maior proporção de lípidos insaturados em relação aos saturados.

Estudos com bactérias têm indicado que a inativação microbiana eficaz, envolvendo várias reduções decimais de micro-organismos vegetativos é possível, mas irá exigir pressões na faixa de 200-300 MPa. Também tem sido relatado que bactérias gram-negativas e células em fase exponencial de crescimento, respectivamente, são mais sensíveis à pressão do que bactérias gram-positivas e células em fase estacionária precoce (DIELS et al., 2003; VACHON et al., 2002; WUYTACK et al., 2002;). Esporos bacterianos e ascósporos de fungos são, geralmente, considerados barorresistentes (CHAPMAN et al., 2007).

O processamento por AP é eficaz em células vegetativas, como é mostrado pelo estudo de Linton et al. (1999). Esses autores mostraram que um tratamento por pressão de 550 MPa, durante 5 minutos, a 20 °C, produziu

inativação de 6 ciclos log de *E. coli* O157:H7, em suco de laranja com pH 3,4-4,5, mas não houve redução em pH 5. Porém, um aumento na temperatura de processamento para 30 °C levou a redução de 6 ciclos log no pH 5.

A inativação de esporos bacterianos (HAYAKAWA et al. 1996) e fúngicos (MAGGI et al. 1994) são difíceis pelo processamento por AP, assim como pelo processamento térmico. Entretanto, alguns autores (KALCHAYANAND et al., 2004; WUYTACK et al., 1997; SALE et al., 1970) demonstraram que esse processo resulta na germinação de esporos.

Smelt (1998) descreveu que, em geral, os esporos bacterianos só podem ser inativados por pressões muito altas (acima de 1.000 MPa). Esses esporos, no entanto, muitas vezes podem ser estimulados a germinar em pressões de 50 a 300 MPa. Os esporos germinados, por sua vez, exibem menor resistência e podem ser inativados por tratamento térmico ou de pressão relativamente suaves. No entanto, na maioria dos casos, uma pequena fração de esporos ainda pode sobreviver a este tratamento.

Syed et al. (2012) estudaram o efeito da mudança dos níveis de compressão e descompressão no processamento por alta pressão e concluíram que, a compressão lenta combinada com descompressão lenta tem maior impacto sobre a inativação de esporos *Bacillus subtilis* do que quaisquer combinações de compressão e descompressão rápidas.

Daryaei e Balassubramanian et al. (2013), em estudos com esporos de *Bacillus coagulans* em suco de tomate, observaram que foi possível inativá-los (<10 UFC mL<sup>-1</sup>) a 600 MPa com tempos de retenção de pressão de 10, 7, 4 e 3 min e 40 s a 75, 85, 95, 100 e 105 °C, respectivamente, sem crescimento microbiano durante o armazenamento subsequente das amostras a 37 °C.

## 2.7. ESPOROS

Segundo Oshero e May (2001), a pressão seletiva para alguns microorganismos sobreviverem e se propagarem durante tempos de condições ambientais adversas levou muitas espécies a desenvolverem estratégias que incorporam cápsulas dessecadas dormentes denominadas esporos. De acordo com os mesmos autores, os esporos são como “cofres” genômicos que podem sobreviver durante grandes períodos de tempo, preservando a espécie.

Black et al. (2007a) ainda descreveram que o processo de esporulação é iniciado quando existe uma falta de nutrientes. A elevada resistência dos esporos a numerosos fatores de estresses como calor, radiação, dessecação, produtos químicos, deve-se principalmente à sua estrutura particular formada por uma série de camadas. O córtex, que é responsável pelo estabelecimento e manutenção do baixo teor de água no núcleo de esporos, é, provavelmente, a principal origem da resistência de esporos a alta pressão.

## 2.8. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS

A germinação dos esporos é um passo fundamental para que os fungos possam causar deterioração dos alimentos. A massa micelial aparece logo após a conclusão da germinação (DANTIGNY et al., 2006, DANTIGNY et al., 2005).

Ascósporos apresentam-se em estado de dormência, que só pode ser quebrado por meio de um tratamento sub-letal que permita a sua germinação e crescimento (formação do micélio) sob condições favoráveis. Esse tratamento é chamado de tratamento de ativação (BEUCHAT, 1988; SPLITTSTOESSER et al., 1993). De acordo com Eicher e Ludwig (2002), uma vez ativados, os esporos preservam a capacidade de germinar. Isto foi demonstrado por esses pesquisadores, ao manterem os esporos ativados em solução isotônica de NaCl a 20 °C sem adição de nutrientes.

O aumento na contagem de colônias de esporos é também chamado de ativação e tem sido, frequentemente, observado durante o tratamento térmico sub-letal que permite a germinação e crescimento de esporos tanto de bactérias quanto de fungos (SPLITTSTOESSER et al., 1993; BEUCHAT, 1988).

De acordo com Black et al. (2007b), a dormência de esporos pode ser quebrada por meio de vários métodos. Embora os esporos dormentes sejam extremamente resistentes ao calor, radiação e substâncias químicas tóxicas, os esporos ativados, e, ou germinados perdem muito desta resistência inerente. Essa característica parece ser o principal motivo pelo qual a alta pressão inativa esporos. Tendo em vista a necessidade ativação de germinação de

esporos para posterior inativação por AP, é primordial compreender o processo de ativação e germinação esporos.

Ainda, sobre a diminuição da resistência dos esporos pós quebra de dormência, Eicher e Ludwig (2002) demonstraram que a inativação por alta pressão é mais efetiva quando aplicada logo após a ativação dos ascósporos, se comparado com uso somente da pressão sem prévia ativação. Baseados nisso, esses autores elaboraram um esquema que conecta a ativação, a germinação e a inativação por altas pressões (Figura 1).

Germinação de esporos é um estágio essencial no desenvolvimento do ciclo de vida de todos os fungos filamentosos. Três passos importantes podem ser distinguidos durante a germinação de esporos: 1) ativação do esporo em repouso em resposta a condições ambientais adequadas, 2) crescimento resultante da absorção de água e a retomada das atividades metabólicas e, 3) crescimento que resulta na formação de tubo germinativo a partir do qual se origina o novo micélio (d'ENFERT, 1997).

O baixo teor de água de ascósporos é, provavelmente, a principal razão para a sua estabilidade durante a dormência (EICHER e LUDWIG, 2002).

Dantigny e Nanguy (2009) propõem que a influência da idade dos esporos de fungos, das condições de esporulação e pós-esporulação, da re-hidratação, e do meio utilizado para esporulação podem conduzir a diferentes concentrações de água no interior dos esporos de fungos, isso pode ajudar a explicar as diferenças na resistência entre micro-organismos da mesma espécie.

Dessa forma, Dantigny e Nanguy (2009) sugerem que a atividade da água intracelular pode ser usada como um indicador para a avaliação do estado fisiológico de esporos fúngicos e, conseqüentemente, de sua resistência, mas para isso é necessário o desenvolvimento de dispositivos que permitam medições diretas ou indiretas da atividade de água intracelular de esporos de fungos.

A Figura 1, com modificações, apresenta esquematicamente a ativação seguida da germinação de esporos de fungos (EICHER e LUDWIG, 2002 ).

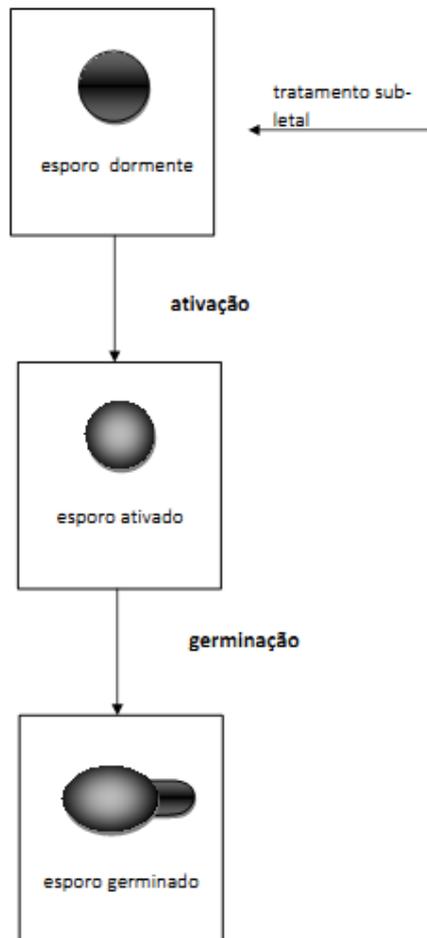


Figura 1. Representação esquemática da ativação e germinação de ascósporos. Fonte: EICHER e LUDWIG (2002), modificado.

Segundo Dantigny et al. (2007b), a contaminação de alimentos por esporos de fungos acontece em quantidades baixas, porém a probabilidade de que a germinação desses esporos leve a um produto deteriorado depende, essencialmente, da capacidade desses esporos em germinar.

Dantigny et al. (2006), definiram que, a princípio, um esporo é considerado germinado, comparando-se o tamanho do tubo germinativo com o próprio esporo, sendo que esse último considerado de forma arredondada. Esses autores relatam que, após o primeiro Workshop em Micologia Preditiva em Marselha, França, em 2 a 4 de fevereiro de 2005 e de acordo com a Sociedade de Microbiologia Francesa, ficou padronizado que um esporo é considerado germinado quando o tubo germinativo é maior ou igual a maior dimensão do esporo túrgido. Segundo os mesmos autores, técnicas de

observação em microscópio são difíceis de serem validadas em meios opacos como alimentos. Assim técnicas alternativas devem ser desenvolvidas para serem definidas como rotineiras, uma vez que observações microscópicas são muito laboriosas.

## 2.9. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS

De acordo com Black et al. (2007a) a ativação da germinação de esporos de bactérias são mais extensamente estudados. Em especial, a germinação dos esporos bacterianos de *Bacillus subtilis*, devido à riqueza de informação genética disponível para a espécie e à facilidade que cepas mutantes podem ser geradas. E segundo os mesmos autores, quando foi possível estudos com outras espécies, verificou-se semelhança nos mecanismos elucidados e até mesmo com outros gêneros como *Clostridium*.

De acordo com Vepachedu e Setlow (2007) e Tovar-Rojo et al. (2002), na membrana interna do esporo existem receptores germinantes, que desencadeiam ativação da germinação, porém a concentração desses receptores é pequena, cerca de 10 a 100 receptores germinantes por esporo. Esses mesmos autores descrevem que a ativação (Figura 2) desses receptores leva à liberação de íons do núcleo de esporos, incluindo a perda de  $K^+$ ,  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ DPA (dipicolinato de cálcio).

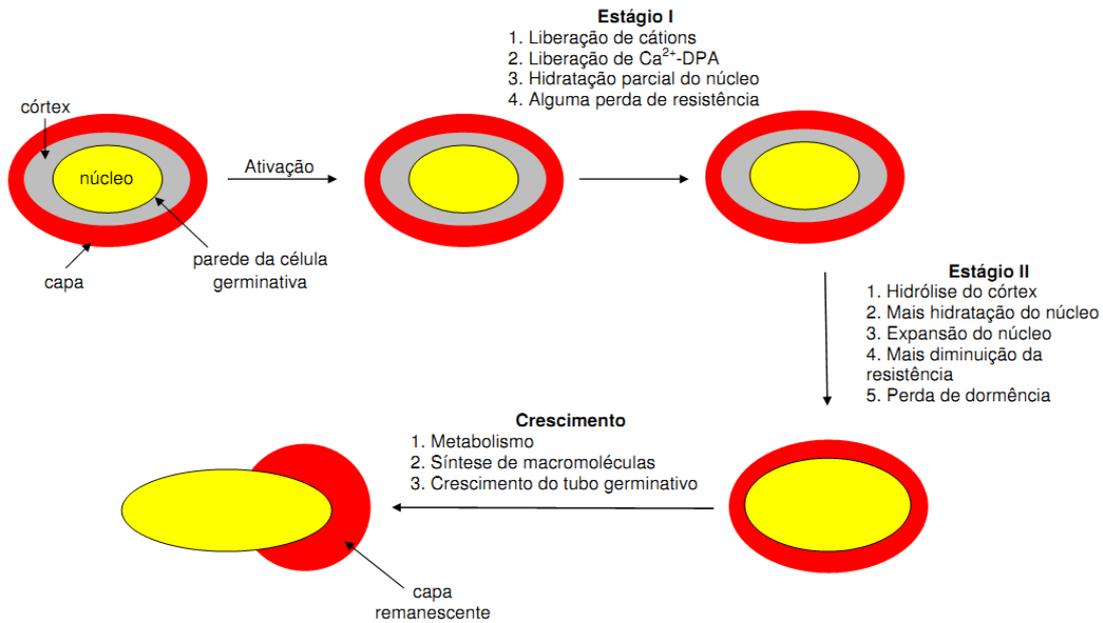


Figura 2. Esquema de ativação e germinação de esporos de bactéria baseado em estudos com o gênero *Bacillus*. Fonte: SETLOW, (2003) (modificado).

Ao mesmo tempo em que há liberação desses compostos, há movimento de água para o interior do núcleo do esporo, presumivelmente ela ocupa o espaço liberado pelo ácido dipicolínico (DPA) (BLACK et al., 2007b).

No estágio I (Figura 2), o esporo ainda permanece metabolicamente inativo e, nessa fase, permanecem resistentes à radiação ultravioleta e ao peróxido de hidrogênio, mas perdem algumas de suas propriedades de resistência, em particular a resistência ao calor úmido, devido ao aumento do conteúdo de água no núcleo (BLACK et al., 2007b).

O estágio II (Figura 2) é marcado pela hidrólise do córtex, que permite que o núcleo aumente de 2 a 3 vezes, elevando o teor de água para valores semelhantes da célula em crescimento e as enzimas do núcleo começam a operar (COWAN et al., 2003; PAIDHUNGAT e SETLOW, 2002).

Com a conclusão da fase II da germinação e início da atividade das enzimas no núcleo do esporo, a germinação dos esporos é completa e leva conversão do esporo em uma célula apta a se multiplicar (BLACK et al., 2007 b).

O mecanismo pelo qual a pressão provoca a ativação da germinação de esporos pode variar de acordo com os níveis de pressão. As pressões moderadas (50 a 300 MPa) funcionam como um gatilho da germinação,

ativando os receptores de nutrientes do esporo, dando início aos eventos subsequentes (BLACK et al., 2005; PAIDHUNGAT et al., 2002; WUYTACK et al., 2000), de maneira que os esporos em que faltam receptores de nutrientes, ou os têm em pequena quantidade, não germinam nesses níveis de pressão (PELCZAR et al., 2007; BLACK et al., 2005; PAIDHUNGAT et al., 2002; WUYTACK et al., 2000).

Já as pressões altas (400 a 800 MPa) não provocam a germinação através dos receptores de nutrientes (BLACK et al., 2005; PAIDHUNGAT et al., 2002; WUYTACK et al., 2000) mas levam diretamente à liberação  $\text{Ca}^{2+}$ -DPA, que, nesse caso, é o que dispara os eventos subsequentes da germinação.

#### 2.10. *Byssochlamys nivea*

O gênero *Byssochlamys* foi descrito pela primeira vez na Grã-Bretanha na década de 1930 e, desde então, tem sido documentado em vários países ao redor do mundo (BEUCHAT e RICE, 1979). *Byssochlamys nivea* (Figura 3) primeiramente identificado como um fungo produtor de patulina foi denominado de *Gymnoascus* sp. (KAROW e FORSTER, 1944; KUEHN, 1958).

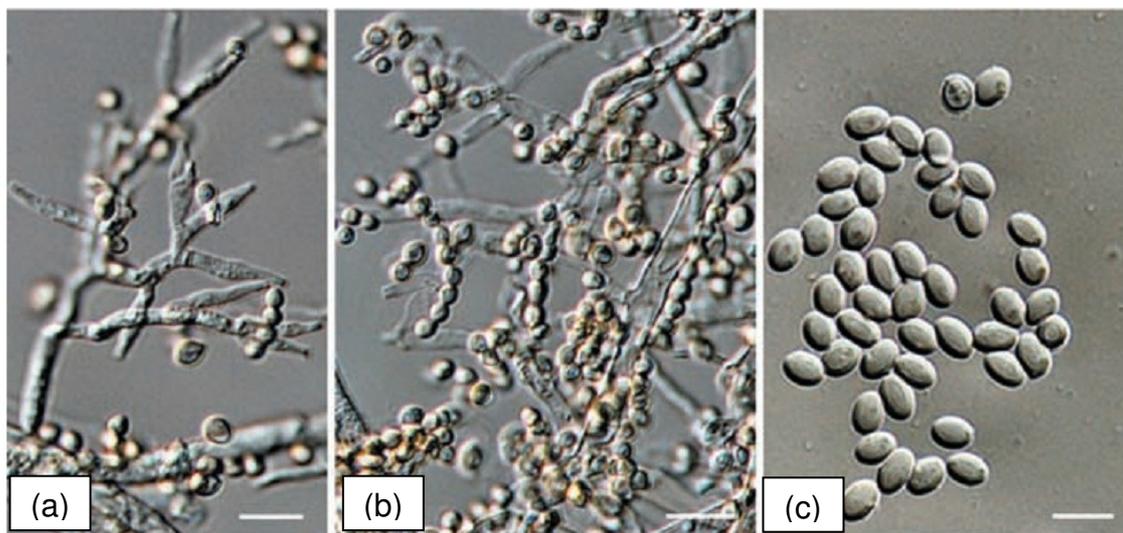


Figura 3. *Byssochlamys nivea* (a) Conidióforos; (b) conídios; (c) ascósporos.  
FONTE: SAMSON et al., (2009), modificado.

As espécies do gênero *Byssochlamys* são fungos filamentosos que produzem ascósporos capazes de sobreviver até 45 minutos a 85 °C e produzem enzimas pectinolíticas causando a deterioração de alimentos ácidos

e pasteurizados pelo calor (HOSOYA et al., 2012; SLONGO et al., 2007; SPLITTSTOESSER 1987).

De acordo com Chapman et al. (2007), o solo é a principal fonte de contaminação de frutas por fungos filamentosos termorresistentes, seja por contato direto, por meios de transporte ou por chuva.

Análises filogenéticas feitas por Samson et al. (2009), incluem nove espécies dentro do gênero: *B. nivea* (Figura 3), *B. fulva*, *B. lagunculariae*, *B. spectabilis*, *B. zolleniae*, *Paecilomyces brunneolos*, *P. divaricatus*, *P. formosus* e *P. saturatus*. Sendo que as cinco primeiras espécies citadas possuem um estado teleomórfico, com produção de esporos sexuados e, enquanto as quatro últimas espécies produzem apenas esporos que são assexuados.

A deterioração de produtos à base de frutas é ocasionada pela capacidade dos fungos em produzir enzimas pectinolíticas e outras exoenzimas tais como: proteolíticas, lipolíticas.

A patulina é definida como um contaminante termorresistente em alimentos e produzida por espécies do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssochlamys* (CELLI et al., 2009). A ingestão diária máxima tolerável é de 0,0004 mg/kg de peso corporal em humanos, quando encontrada em suco de maçã (CODEX ALIMENTARIUS).

O controle da incidência e da contaminação desses fungos deve ser uma preocupação da indústria de alimentos (SANT'ANA et al., 2010) pela sua capacidade de sobreviver aos tratamentos térmicos comumente aplicados, sendo assim potenciais produtores da micotoxina pós-estágio de pasteurização (HOSOYA et al., 2012; SANT'ANA et al., 2008).

### **2.10.1. Termorresistência e barorresistência**

Os fungos são responsáveis pela deterioração significativa e perdas econômicas na cadeia alimentar (MAGAN e OLSEN, 2004). A base da resistência dos fungos filamentosos termorresistentes é a produção do estado denominado teleomórfico, ou seja, os ascósporos. Eles são produzidos geralmente em grupo de 8 ascósporos e ficam dentro de um envoltório denominado de asco (MASSAGUER, 2005).

Palou et al. (1998), em estudos com *B.nivea* descrevem que o fungo sobrevive a 75 °C, por 30 minutos. Estes autores observaram que a alta pressão podia romper os ascos e promover a liberação dos ascósporos. Como resultado, Palou et al., (1998) verificaram um aumento no número de ascósporos, embora, paralelamente, os ascósporos ativados puderam ser inativados pela alta pressão. Dessa forma, nessa pesquisa, os sobreviventes representavam a soma da taxa de liberação de esporos dos ascos e a taxa de inativação dos ascósporos ativados por pressão.

Em outro estudo, Ferreira et al. (2009) observaram que a tecnologia de alta pressão hidrostática mostrou-se efetiva na inativação de conídios, (360 a 380 MPa, por 15 a 20 minutos, para néctar de abacaxi, e 300-400 MPa, por 10 a 20 minutos, para o suco integral de abacaxi), porém não foi suficiente para eliminar os ascósporos. Esses só foram inativados quando foi aplicada pressão contínua (600 MPa e 90 °C por 15 min.) ou ciclos de pressão (3 ciclos de 5 min. ou 5 ciclos de 3 min. a 600 MPa e 80 °C) associados à tratamentos térmicos.

Butz et al. (1996) estudaram a suscetibilidade de várias espécies produtoras de ascósporos em diferentes tempos e substratos, tais como: *B. nivea*, *B. fulva*, *Eurotium (Aspergillus fischeri)*, *Eupenicillium* spp. e *Paecilomyces* spp. a um tratamento de pressão-temperatura combinado e concluíram que são necessárias pressões acima de 600 MPa e temperaturas acima de 60 °C para começar a haver reduções significativas na contagem da espécie *B. nivea*. As outras espécies tiveram reduções significativas abaixo desses níveis de pressão e temperatura.

Segundo Ferreira (2009) seria necessário os seguintes tratamentos térmicos para a inativação do *B. nivea*: 98 °C/ 13,05 min. ou 103 °C/ 2,00 min. ou 108 °C/ 1,08 min., em néctar de abacaxi. Já no suco integral de abacaxi, de acordo com esses mesmos autores, seriam necessários tratamentos de 98 °C/ 10,34 min. ou 103 °C/ 2,23 min. ou 108 °C/ 1,21 min. A Tabela 2 apresenta os valores de D para o *Byssochlamys nivea* em diferentes temperaturas e substratos.

Tabela 2. Valor D para *Byssochlamys nivea* em diferentes temperaturas e substratos

Substrato	Valor D (minutos)	Referência
Suco de maçã	2,00 a 85 °C	Hosoya et al. (2012)
Solução salina	1,40 a 85 °C	Hosoya et al. (2012)
Suco de maçã	15,40 a 80 °C	Hosoya et al. (2012)
Solução salina	13,80 a 80 °C	Hosoya et al. (2012)
Suco de abacaxi	27,00 a 98 °C	Ferreira et al. (2011)
Suco de maçã	12,89 a 85 °C	Hoffmann (2004)
Suco de laranja	2,03 a 90 °C	Gressoni (2002)

De acordo com Gressoni (2002) os valores D para o *Byssochlamys* são considerados altos, e os processos utilizados para pasteurização de sucos (90° – 95°C por 10 a 30 segundos) não são suficientes para eliminação dos mesmos e de acordo com Hoffman (2004) o *Byssochlamys nivea* sobrevive aos tratamentos de pasteurização normalmente aplicados para suco de maçã (90-92 °C por 20-60 segundos). Assim, pressões superiores a 600 MPa em conjunto com temperaturas acima de 60 °C são necessárias para inativar ascósporos de fungos termorresistentes (PALOU et al., 1998; BUTZ et al., 1996).

#### 2.11. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

*Alicyclobacillus* é um gênero de grande preocupação para a indústria de alimentos. Por causa da sua natureza termo-acidofílica, há cada vez mais relatos da presença de espécies do gênero em alimentos ácidos à base de frutas como: sucos, polpas e purês (STEYN et al., 2011).

De acordo com Wisotzkey et al. (1992), o gênero *Alicyclobacillus* foi inicialmente classificado como *Bacillus*, mas foi reclassificado em 1992, como *Alicyclobacillus*. Segundo esses mesmos autores, a característica única destes organismos que é a presença de ácidos graxos  $\omega$ -alicíclicos, tais como, o  $\omega$ -ciclo-hexano e  $\omega$ -ciclo-heptano como principais componentes da membrana celular, foi o motivo da reclassificação.

De acordo com Euzèby (2012), atualmente, são 20 espécies e 2 subespécies de *Alicyclobacillus*. Algumas, que foram identificadas primeiramente em alimentos, estão apresentadas na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3. Espécies de *Alicyclobacillus* primeiramente identificadas em alimentos.

<b>Espécies e subespécies</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	Bebidas ácidas	Matsubara et al. (2002)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Solo, Suco de maçã	Deinhard et al. (1987a), Wisotzkey et al. (1992)
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	Suco de maçã	Goto et al. (2007)
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	Chá herbal	Goto et al. (2002)
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	Mix de suco de fruta	Goto et al. (2003)

Fonte: Euzèby (2012).

A espécie *A. acidoterrestris* compreende bactérias aeróbias estritas, acidófilas, termofílicas e formadoras de esporos, denominada TAB (“Thermotolerant Acidophilic Bacilli ou Bacteria”). Sua forma é bacilar (0,3 a 0,8 µm x 2 a 4,5 µm), são gram-positivos, além disso, requerem temperaturas elevadas (40 a 70 °C) e condições de pH baixo (2-6) para o seu desenvolvimento (IFU, 2004). Estas espécies foram isoladas a partir de frutos, vegetais, sucos, purês, xaropes, bebidas e outros produtos alimentares de baixo pH, assim como do solo e da água de processo (SMIT et al., 2011).

São considerados micro-organismos que produzem 2-6 dibromofenol e 2-metoxifenol, o guaiacol, o qual leva ao aparecimento de “off-flavor” (WALLS e CHUYATE, 2000). Pettipher et al. (1997) concluíram que são necessárias 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células / mL de *A. acidoterrestris* em sucos de maçã e laranja para produzir guaiacol (ppb) sensorialmente detectável.

De todas as espécies do gênero, *A. acidoterrestris* é a de maior impacto sobre a indústria de sucos, uma vez que a presença de 1 a 10 esporos por mL de suco é suficiente para causar deterioração (STEYN et al., 2011). Por isso, a tolerância mundial no que diz respeito à presença de *Alicyclobacillus* é variável,

no entanto, aproximadamente 62% dos países importadores exigem sua ausência (OTEIZA, 2011).

De acordo com Cerny et al. (1984), o primeiro relato de deterioração causada por *A. acidoterrestris*, em larga escala, foi em 1982 em suco de maçã processado, na Alemanha. Essa deterioração é descrita como do tipo “flat sour” ou acidez plana, que se caracteriza pela produção de ácido sem formação de gás (LUCAS et al., 2006). Esse tipo de deterioração foi encontrado, como característica, da primeira vez que o *A. acidoterrestris* foi isolado no suco de maçã industrializado (CERNY et al., 1984) .

A deterioração do alimento por *A. acidoterrestris* leva à produção de metabólitos com odor (CHANG e KANG, 2004) caracterizado como medicinal ou antiséptico (CERNY et a., 1984). O suco impróprio para o consumo parece normal visualmente, por isso esse tipo de deterioração é considerado difícil de ser detectado, a não ser pelas características peculiares do odor (CHANG e KANG, 2004).

### **2.11.1. Termorresistência e barorresistência**

De modo geral, a indústria de bebidas de fruta aplica um processo de pasteurização de enchimento a quente, em que o produto é mantido a 86-96 °C durante, aproximadamente, 2 minutos, com vistas à destruição de micro-organismos deterioradores mesófilos (JAY et al., 2005; CHANG e KANG, 2004).

Os esporos de *A. acidoterrestris* possuem a capacidade de resistir a temperaturas de 120 °C (WALLS e CHUYATE, 2000), por isso o processo de pasteurização que pode destruir as formas vegetativas de micro-organismos não é suficiente para esses esporos resistentes termicamente.

Silva et al. (2012), em estudos com esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja, conseguiram redução de 2 ciclos log aplicando 600 MPa e 65°C por 10 minutos. Os mesmos autores relataram que o micro-organismo é capaz de sobreviver 3,4 minutos a 600 MPa a 65 °C.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. Embalagem para sucos de frutas. *Coletânea do ITAL*, v. 2, n. 23, p. 105-122, 1993.

AN, H.; CALIK, H.; HE, H.; ADAMS R.; MORRISSEY, M. T. Use of high hydrostatic pressure to control pathogens in raw oysters. *Journal of Shellfish Research*, v.19, p. 655–656, 2000

AOUADHI, C.; SIMONIN, H.; PRÉVOST, H.; LAMBALLERIE, M. DE; MAAROUFI, A.; MEJRI, S. Optimization of pressure-induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and Milk. *Food Microbiology*, v. 30, p. 1-7, 2012.

BALASUBRAMANIAM, V.M.; TING, E.Y.; STEWART, C.M.; ROBBINS, J.A. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 5, p. 299–306, 2004.

BEUCHAT, L.R. Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium, age and sugar content in the inactivation. *Transaction of British Mycological Society*, v. 40, n. 3, p. 359–364, 1988.

BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. *Advances in Food Research*, v.25, p. 237–288, 1979.

BLACK, E.P.; KOZIOL-DUBE, K.; GUAN, D.; WEI J.; SETLOW, B.; CORTEZZO, D.E.; HOOVER, D.G.; SETLOW, P. Factors influencing the germination of *Bacillus subtilis* spores via the activation of nutrient receptors by high pressure. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, n. 58 79–87, 2005.

BLACK, E.P.; SETLOW, P.; HOCKING, A.D.; STEWART, C.M.; KELLY A.L.; HOOVER D.G. Response of Spores to High-Pressure Processing. *Comprehensive Food Science and Food Safety*, v. 6, p. 103- 119, 2007a.

BLACK, E.P.; WEI, J.; ATLURI, S.; CORTEZZO, D.E.; KOZIOL-DUBE, K.;HOOVER, D.G.; SETLOW, P. Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *Journal Applied Microbiology*, v.101, p. 65–76, 2007b.

BORGES, A.C.G.; TOLEDO, J.C. O processo para obtenção da qualidade do suco de laranja concentrado congelado brasileiro. *Gestão & Produção*, v.6, n.2, p. 97-110, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. *Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994*. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. Disponível em:

<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8918.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8918.htm)>. Acesso em: 22 de out. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. *Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000*. Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. *Diário oficial da República Federativa*. Brasília (DF), 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001*. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário oficial da República Federativa*. Brasília (DF), 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). *Decreto nº 6871*. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília (DF), 4 de julho de 2009.

BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T; TAUSCHER, B. High Pressure Inactivation of *Byssochlamys nivea* Ascospores and Other Heat Resistant Moulds. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 29, p. 404–410, 1996.

CELLI, M.G.; COELHO A.R.; WOSIACKI, GILVAN; GARCIA-CRUZ, C.H. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. In: *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 30, n. 1, p. 135-162, 2009.

CERNY, G.; W. HENNLICH; K. PORALLA. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage organism. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, v.179, p.224-227, 1984.

CHANG, S.S.; KANG, D.H. Development of novel *Alicyclobacillus* spp. isolation medium. *Journal Applied Microbiology*, v. 99, p. 1051–1060, 2005.

CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A.S.W.; HOCKING, A.D.; STEWART, C.M.; BUCKLE, K.A. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 8, p. 531–534, 2007.

CHEFTEL, J.C. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, and P. Masson editors, *High Pressure and Biotechnology*. London, UK: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, Ltd., p. 195–209, 1992.

CITRUS BR. Associação Nacional dos exportadores de frutos cítricos. Da embalagem ao copo. [online], 2012. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/o-setor/da-embalagem-ao-copo-249497-1.asp>>. Acesso em: 11 de dezembro 2012.

CODEX STANDARD 1993-1995. Norma General Del CODEX para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Disponível

em:<[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/livestockgov/documents/CXS\\_193s.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXS_193s.pdf)>. Acesso em: 13 de dez. 2012.

CORRÊA NETO, R.J.; FARIA, J.A.F. Fatores que influenciam na qualidade do suco de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 1, p. 153-160, 1999.

COWAN A.; KOPPEL D.E.; SETLOW B.; SETLOW P. A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. *Proceedings the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 100, p. 4209–14, 2003.

DANTIGNY, P.; BENSOUSSAN, M.; VASSEUR, V.; LEBRIHI, A.; BUCHET, C., ISMAILI-ALAOUI, M.; DEVLIEGHIERE, F.; SÉVASTIANOS, R. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology*, v.108, p.286–291, 2006.

DANTIGNY, P.; DAO, T.; DEJARDIN, J.; BENSOUSSAN, M. Effect of ethanol vapours on inactivation of fungal spores. In: Nychas, G.J.E., Taoukis, P., Koutsoumanis, K., Van Impe, J., Geeraerd, A. (Eds.), Proceedings of the 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods. In Athens, Greece, p. 257–260. 16–19, 2007.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predict mycology. *International Journal of Food Microbiology*, v.100, p.187–196, 2005.

DANTIGNY, P.; NANGUY, S.P. Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, p. 16–20, 2009.

DARYAEI, H.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Kinetics of *Bacillus coagulans* spore inactivation in tomato juice by combined pressure and heat treatment. *Food Control*, 30, 168-175, 2013.

DELIZA, R.; ROSENTHAL A.; ABADIO, F.B.D.; CARLOS, O.H.S.; CASTILHO C. Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 241–246, 2006.

DELLA TORRE, J.C.M.; RODAS, M.A.B.; BADOLATO, G.G.; TADINI, C.C. Perfil sensorial e aceitação de suco de laranja pasteurizado minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.2, 2003.

d'ENFERT, C. Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 21, p.163–172, 1997.

DIELS, A.M.J.; WUYTACK, E.Y.; MICHIELS, C.W. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 87, p.55–62, 2003.

DUVENAGE, W. *Detection and isolation of thermophilic and acidophilic bacteria from fruit juices*. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade de Stellenbosch, Stellenbosch, África do Sul. 2006.

EGUCHI, S.Y.; MANFIO, G.P.; PINHATTI, E.; AZUMA, E.; VARIANE, S.E. Acidothermophilic sporeforming bactéria (ATSB) in orange juice. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. *Part.1 Fruit Processing*, v.1, p.2-18, 2001.

EICHER, R. e LUDWIG, H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 131, p. 595–604, 2002.

EIROA, M.N.U.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SCHMIDT, F.L. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 8, p. 883-886, 1999.

EUZÉBY, J.P., 2010. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Disponível em: <[WWW document]. URL <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>>. Acesso em: 09 dez. 2012.

FELLERS, P.J. 1992. Citrus industry. In: *Encyclopaedia of Food Science and Technology*. New York: John Wiley and Sons Inc. p. 420-438.

FERREIRA, E.H.R. *Avaliação da barorresistência e da termorresistência de *Byssochlamys nivea* em néctar e suco integral de abacaxi*. 2009. 148 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

FERREIRA, E.H.R.; MASSON, L.M.P.; ROSENTHAL, A.; SOUZA, M.L.; TASHIMA, L.; MASSAGUER, P.R. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, n. 3, p. 164-171, 2011.

FERREIRA, E.H.R.; ROSENTHAL, A.; CALADO, V.; SARAIVA, J.; MENDO, S. *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 664–669, 2009.

FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; QUEIROZ, E.C.; PEREIRA, A.G.S. Análise físico-química e legalidade em bebidas de laranja. *Alimentos e Nutrição*, v. 21, n. 2, p. 267-272, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*, Editora Atheneu, 182p, 2008.

GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology*, v. 52, p.109-113, 2002.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; KASAI, H.; YOKOTA A. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutinary Microbiology*, v. 53, p. 1537-1544, 2003.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; KATO, Y.; ASAHARA, M.; FUJITA, R.; AN, S.Y.; KASAI, H.; YOKOTA, A. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioides* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutinary Microbiology*, v.57, p. 1276-1285, 2007.

GRESSONI JUNIOR, I. *APPCC base para sucos processados assepticamente*. 2002. 18 de abril 2002. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 2002.

HAYAKAWA, I.; LINKO, Y.; LINKO, P. Novel Mechanical Treatments of Biomaterials. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v.29, p.395–403, Academic Press, 1996.

HARRICHANDPARSAD, Z. *Evaluation of bacteriological techniques, sensory evaluation, gas chromatography and electronic nose technology for the early detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices*. 2007. 106 f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade de Durban, Durban, África do Sul, 2007.

HOFFMAN, M.V.G.S. *Estudo de resistência térmica de Byssochlamys nivea e Talaromyces flavus em suco de maçã*. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2004.

HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, v.43, n.3, p.99–107, 1989.

HOSOYA, K.; NAKAYAMA, M.; MATSUZAWA, T.; IMANISHI Y.; HITOMI, J.; Yaguchi, T. Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssochlamys*. *Food Control*, v. 26, p. 169-173, 2012.

IBRAF (Instituto Brasileiro de Frutas). Fruit Tech 2010: no lugar certo, na hora certa. [online], 2010.

Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/news/news\\_item.asp?NewsID=7027](http://www.ibraf.org.br/news/news_item.asp?NewsID=7027)>  
Acesso em: 11 de dezembro 2012.

IBRAF (Instituto Brasileiro de Frutas). Incentivo à Produção. [online], 2009.  
Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/news/news\\_item.asp?NewsID=612](http://www.ibraf.org.br/news/news_item.asp?NewsID=612)>  
Acesso em: 11 de dezembro 2012.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. 7<sup>a</sup> ed. Modern Food Microbiology. Springer Science + Business Media, Inc., New York, p. 39–59, 2005.

KALCHAYANANDA, N.; DUNNE, C.P.; SIKES, A.; RAYA, B. Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.5, p. 277–283, 2004.

KAROW E.O.; FORSTER J.W.. An antibiotic substance from a species of *Gymnoascus* and *Penicillium*. *Science*, v.99, p. 265–266, 1944.

KNNOR, D. Hydrostatic pressure treatment of food: Microbiology. IN: New Methods of Food Preservation. Ed. G.W. Gold. New York. p.159. 1995.

KREŠIĆ, G. ; LELAS, V. ; REŽEK JAMBRAK, A. ; HERCEG, Z. Application of High Pressure in Food Processing. *Kemija u Industriji*, v.60, n.01, p.11, 2011.

LINTON, M.; MCCLEMENTS, J.M.J.; PATTERSON, M.F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *Journal of Food Protection*, v. 62, p. 277–279, 1999.

LUCAS, R. et al. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

MACKEY, B. M.; FORESTIERE, K.; ISAACS, N. S.; STENNING, R.; BROOKER, B. The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters Applied Microbiology*, v.19, p. 429–432, 1994.

MAGAN, N., OLSEN, M., 2004. Mycotoxins in Food: Detection and Control. Woodhead Publishing, United Kingdom.

MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. *Industria Conserve*, v.69, p.26-29, 1994.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>>. Acesso em: 08/12/2012.

MASSAGUER, P.R. Microbiologia dos processos alimentares. Livraria Varela, São Paulo. 2005.

MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermoacidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v. 52, p.1681-1685, 2002.

MENTRÈ, P. e HOA, G.H.B. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *International Review of Cytology*, v. 201, p. 1–84, 2001.

METRICK, C.; HOOVER, D. G.; FARKAS, D. F. Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, v. 54, p.1547–1549, 1989.

OSHEROV, N. e MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination: Mini Review. *FEMS Microbiology Letters*, v.199, p.153-160, 2001.

OTEIZA, J.M. Imágenes Microbiológicas: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 43, v.67, 2011.

PAIDHUNGAT M, SETLOW P. Spore germination and outgrowth. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis* and its relatives: from genes to cells. Washington, D.C.: *American Society for Microbiology*. p 537–48, 2002.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTICHANES, J.; DAVIDSON, P.M.; SWANSON, B.G.. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *Byssochlamys nivea* ascospores suspended in fruit juice concentrates. *Letters in Applied Microbiology*, v. 27, p.375–378, 1998.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, v.58, p. 524–529, 1995.

PELCZAR, P.L.; IGARASHI, T.; SETLOW, D.; SETLOW, P. The role of GerD in the germination of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p.1090–98, 2007.

PETTIPHER, G.L., OSMUNDSON, M.E., MURPHY, J.M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, v. 24, p. 185–189, 1997.

PILAVTEPE-ÇELİK, M.; BUZRUL, S.; ALPAS, H.; BOZOĞLU, F. Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 388–394, 2009.

RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 659–672, 2010.

RYU, J-H. e BEUCHAT, L.R. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified

media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, p.185–193, 1998.

SALE, A.J.H.; GOULD, G.W.; HAMILTON, W.A. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*, v.60, p.323-334, 1970.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, v. 22, p. 14–27, 2009.

SANT'ANA, A.S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER P.R. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, v.41, n. 5, p.441–453, 2008.

SANT'ANA, A.S.; SIMAS, R.C.; ALMEIDA, C.A.A.; CABRAL, E.C.; RAUBER, R.H.; MALLMANN, C.A.; EBERLIN, M.N.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P.R. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142, n.1–2, p. 156–163, 2010.

SETLOW, P. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier. v. 6, p. 550–556, 2003.

SETLOW, P. Dormant Spores Receive an Unexpected Wake-up Call. Elsevier, 2008.

SILVA, F.V.M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processe. *Trends in Food Science & Technology*, v. 12, p. 68–74, 2001.

SILVA, F.V.M.; TAN, E.K.; FARID, M. Bacterial spore inactivation using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. *Food Microbiology*, v. 32, p. 206-211, 2012.

SLONGO, A.P.; ARAGÃO, G.M.F. Avaliação da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba v. 25, n. 2, p. 217-224, 2007.

SMELT, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 152-158, 1998.

SMIT, Y.; CAMERON, M.; VENTER, P.; WITTHUHN, R.C. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation: A review. *Food Microbiology*, v. 28, p. 331-349, 2011.

SPLITTSTOESSER D.F. Fruits and fruit products. In: Beuchat LR. (ed), *Food and beverage mycology*, 2<sup>a</sup> ed., p. 101–128. Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 1987.

SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P.V.; CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya fischeri*. *Journal of Food Protection*, v. 56, p.599–603, 1993.

SPRINGETT, M.B. In *Food Taints and Off-flavor*. 2<sup>a</sup> ed. Editado por M. J. Saxby. Blackie Academic & Professional, 1996.

STEWART, M. F.; JEWETT, F. F.; DUNNE, C. P.; HOOVER, D. G. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, v.17, p. 23–26, 1997.

STEYN, C.E.; CAMERON, M.; WITTHUHN, R.C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 147, p.1–11, 2011.

STYLES, M. F.; HOOVER, D. G.; FARKAS, D. F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, v.56, p. 1404–1407, 1991.

SUZUKI, A. High pressure-processed foods in Japan and the world. *Progress in Biotechnology*, v.19, p. 365-374, 2002.

SYED, Q.A.; REINEKE, K.; SALDO, J.; BUFFA, M.; GUAMIS B.; KNORR, D. Effect of compression and decompression rates during high hydrostatic pressure processing on inactivation kinetics of bacterial spores at different temperatures. *Food Control*, 25: 361-367, 2012.

TETRA PAK. Process and equipment selection. Practical Design, Construction and Operation of Food Facilities. Elsevier, 2009.

TING, E.; BALASUBRAMANIAN, V.M.; TAGHUBEER, E. Determining thermal effects in high-pressure processing. *Food Technology Feature*, v. 56, n. 2, p. 31–35, 2002.

TORRES, J.A. e VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 95–112, 2005.

TOVAR-ROJO, F.; CHANDER, M.; SETLOW, B.; SETLOW, P. The products of the spoVA operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 7, p.184:584, 2002.

TRIBST, A.A.L.; FRANCHINI, M.A.; CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.3, n.9, p. 265-271, 2008.

TRUJILLO, A.J. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products. *High pressure research*, v.22, n. 3–4, p.619–626, 2002.

- TSURUOKA, N.; ISONO, Y.; SHIDA, O.; HEMMI, H.; NAKAYAMA, T.; NISHINO, T. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.53, p.1081-1084, 2003.
- VACHON, J.F.; KHEADR, E.E.; GIASSON, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I.. Inactivation of Foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, v. 65, p.345–352, 2002.
- VEPACHEDU, V.R. e SETLOW, P. Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature-sensitive spo mutations in the spoVA operon. *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, p.71–7, 2004.
- VEPACHEDU, V.R.; SETLOW, P. Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v.187, p.5677–82, 2005.
- VEPACHEDU, V.R.; SETLOW P. Role of SpoVA proteins in the release of dipicolinic acid during germination of *Bacillus subtilis* spores triggered by dodecylamine or lysozyme. *Journal of Bacteriology*, v.189, p.1565–72, 2007.
- VERCAMMEN, A.; BRAM, V.; LURQUIN, I. MICHIELS, C.W. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology*, v.152, p. 162–167, 2012.
- YALDAGARD, M.; MORTAZAVI, S. A.; TABATABAIE, F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n.16, p. 2739-2767, 2008.
- WALLS, I; CHUYATE, R. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, v. 52, p. 286-8, 2000.
- WINTER, R.; JEWORREK, C. Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*, v.5, p. 3157–3173, 2009.
- WISOTZKEY, J.D.; JURTSUK Jr. P.; FOX, G.E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, v.42, p. 263-269, 1992.
- WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, v.77, p.205–212, 2002.
- WUYTACK, E.Y.; MICHIELS, C.W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 333–341, 2001.

WUYTACK, E.; SOONS, J.; MICHIELS, C. Rapid measurement of pressure-induced germination on *Bacillus subtilis* spores expressing green fluorescent protein. In: High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology, 1997, Leuven. Proceedings... Leuven: Leuven University Press, 1997. p.261.

WUYTACK, E.Y.; SOONS, J.; POSCHET, F.; MICHIELS, C.W. Comparative study of pressure- and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p.257–61, 2000.



# **CAPÍTULO I**

**INDUÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* POR ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

## RESUMO

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Indução da germinação de esporos de *Byssochlamys nivea* por alta pressão e temperaturas médias em suco de laranja integral. 2013.** Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo Alegre, ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Vieira de Carvalho. Co-orientador: Prof. Dr. Wilmer Edgar Luera Peña.

*Byssochlamys nivea* é encontrado em sucos de frutas submetidos a tratamentos térmicos. A espécie produz esporos altamente termoacidófilos que, além de sobreviver aos tratamentos de alta temperatura, podem ter seus esporos germinados devido ao calor, levando à deterioração precoce de sucos causando prejuízos à indústria. A indução da ativação de esporos de *B. nivea*, por alta pressão, antes do tratamento térmico pode ser uma alternativa eficaz para inativar os esporos e conduzir a esterilidade nos sucos. Neste trabalho, a germinação de esporos de *B. nivea* foi avaliada em suco de laranja integral (pH = 3,9) submetido à temperaturas (T) que variaram de 46,6 a 63,4 °C (durante 20 minutos), posteriormente à pressão (P) de 300 a 500 MPa, durante o tempo (t) de retenção que variou de 5 a 15 minutos. O delineamento composto central rotacional (DCCR) com três fatores (T, P e t) e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para estudar a germinação de ascósporos em suco de laranja. Um modelo matemático foi proposto para avaliar a influência dos parâmetros (T, P e t) sobre a germinação dos esporos. A pressão, a temperatura e o tempo foram significativas na taxa de germinação de esporos. A pressão foi o principal fator que contribuiu para o aumento da germinação dos esporos. A menor germinação foi de 3,71 ciclos log a 340 MPa e a maior germinação foi de 5,91 ciclos log em 500 MPa. Este estudo mostra o potencial do uso de alta pressão para induzir a germinação de esporos de *B. nivea* em suco de laranja integral antes do tratamento térmico.

Palavras-chave: *Byssochlamys nivea*, esporos, alta pressão, ativação, suco de laranja.

## ABSTRACT

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Induction of germination of spores *Byssochlamys nivea* high pressure and average temperatures in whole orange juice. 2013.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology) Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Vieira de Carvalho. Coadvisor: Wilmer Edgar Luera Peña.

*Byssochlamys nivea* is found in fruit juices subjected to heat treatments. The species produces spores highly thermoacidophiles that besides surviving the high temperature treatments can have their spores germinated due to heat, leading to early deterioration of juices and causing damage to industry. Induction of activation of *B. nivea* spores before a heat treatment may be an effective alternative to inactivate the spores and lead to sterility in juices. In this work, the germination of *B. nivea* spores was determined in whole orange juice (pH= 3.9) with temperature (T) ranging from 46.6 to 63.4 °C (for 20 minutes), pressure (P) of 300 to 500 MPa, time (t) of retention ranging from 5 to 15 minutes. The central composite rotational design (CCRD) with three factors (T, P and t) and the response surface methodology were utilized to study the germination of ascospores in orange juice. A mathematical model was proposed to evaluate the influence of the parameters (T, P, and t) on spore germination. The pressure, temperature and time were significant at the rate of spore germination. The pressure was the main factor that contributes to the increase in spore germination. The lowest germination was 3.71 log cycles at 340 MPa and higher germination was 5.91 log cycles at 500 MPa. This study shows the potential of using high pressure to induce spore germination of *B. nivea* in whole orange juice prior to heat treatment.

Keywords: *Byssochlamys nivea*, spores, high pressure, activation, orange juice.

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos são responsáveis pela deterioração significativa e perdas econômicas na cadeia alimentar (MAGAN e OLSEN, 2004).

*Byssochlamys nivea* são fungos filamentosos que produzem ascósporos capazes de sobreviverem por tempos consideráveis a mais de 85 °C e produzem enzimas pectinolíticas, causando a deterioração de alimentos ácidos e pasteurizados pelo calor (HOSOYA et al., 2012; SPLITTSTOESSER, 1987). O baixo teor de água dos ascósporos é, provavelmente, a principal razão para a sua estabilidade durante a dormência (EICHER e LUDWIG, 2002).

Eicher e Ludwig (2002) descrevem que a inativação por alta pressão é mais efetiva quando aplicada logo após a ativação dos ascósporos, se comparado com uso somente da pressão sem prévia ativação. Baseados nisso, esses autores elaboraram um esquema que conecta a ativação, a germinação e a inativação por altas pressões.

A contaminação em alimentos por esporos de fungos ocorre em menor escala, porém a probabilidade de germinação desses esporos pode levar a um produto deteriorado, dependendo essencialmente da capacidade desses esporos em germinar (DANTIGNY et al., 2007).

Por serem micro-organismos de difícil controle, pesquisas têm sido realizadas mostrando que a inativação pode ser facilitada quando é feita em dois passos (FERREIRA et al., 2009).

No primeiro passo, um tratamento é dado a fim de levar os esporos à ativação da germinação e no segundo, um tratamento na sequência seria necessário para inativar os esporos sensibilizados (EICHER e LUDWIG 2002).

Em particular, pouco se sabe sobre a ativação e germinação de esporos induzidas por alta pressão sob diferentes condições de processamento em alimentos e se isso é possível em valores baixos de pH. Esta é uma questão relevante porque a inativação de esporos por AP à temperatura moderada é dependente desse evento (WUYTACK e MICHELS, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi estudar os níveis de germinação de esporos de *Byssochlamys nivea* submetidos às temperaturas que variaram de 46,6 a 63,4 °C por 20 minutos, seguidos de tratamentos de alta pressão que variaram de 300 a 500 MPa por tempos de 5 a 15 minutos.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. SUCO DA LARANJA**

#### **2.1.1. Obtenção**

Foram adquiridas laranjas da variedade Pera, do mercado varejista no município de Guaçuí, no mês de março de 2012. As laranjas foram provenientes do estado de São Paulo.

Os frutos lavados em água corrente e submersos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm por 30 minutos, foram posteriormente cortados ao meio e o suco foi obtido utilizando extrator, totalizando cerca de 2,0 L de suco *in natura* integral.

Amostras de suco foram distribuídas em tubos Falcon (15 mL) e esterilizadas a 121 °C por 10 minutos em autoclave. Após resfriamento foram congeladas até o uso.

#### **2.1.2. Análises físico-químicas**

##### **2.1.2.1. Determinação de sólidos solúveis totais (SST)**

A concentração de sólidos solúveis totais foi determinada por refratometria usando refratômetro de bancada do tipo ABBE, conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), em triplicata.

##### **2.1.2.2. Avaliação do pH**

Foi determinado o pH do suco de laranja com potenciômetro digital (Marconi PA-200), em triplicata, de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

##### **2.1.2.3. Acidez total titulável**

A acidez total titulável foi determinada por titulometria, utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 M e indicador fenolftaleína, de acordo com a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), em triplicata, e expressa em gramas de ácido cítrico por 100 mL de suco.

Amostras de 10 mL de suco de laranja foram diluídas em 100 mL de água destilada e foram adicionados 0,3 mL de indicador fenolftaleína. Essa mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 M, sob agitação constante até o aparecimento da cor rósea persistente por 30 segundos (IAL, 2005).

#### 2.1.2.4. Cálculo do Ratio

O valor de ratio pode indicar a palatabilidade de sucos de fruta. Quanto maior o valor do ratio mais doce é a fruta (PEREIRA et al., 2006). Esse índice faz parte do padrão de identidade qualidade (PIQ) dos sucos de frutas de acordo com a Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Esse valor é utilizado nas indústrias de alimentos para identificar o grau de maturação da fruta. É um importante indicador para a produção de sucos cítricos. A acidez titulável diminui com o amadurecimento, o teor de sólidos solúveis aumenta, de maneira que quanto mais madura a fruta maior o valor do ratio, ou seja, maior o teor de sólidos solúveis e menor acidez titulável.

O valor do ratio foi obtido pelo cálculo do quociente entre o SST (sólidos solúveis totais) dado em °Brix e a acidez total titulável. Para alimentos cítricos como o suco de laranja, o valor é expresso em gramas de ácido cítrico por 100 mL de suco.

## 2.2. *Byssochlamys nivea*

### 2.2.1. Cepa utilizada e meios para cultivo e quantificação

Foi utilizada a cepa de *Byssochlamys nivea*, estocada em água destilada esterilizada em pérolas de vidro a 5 °C, do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre/E.S.

O meio utilizado para produção dos ascósporos de *Byssochlamys nivea* foi o meio Ágar Extrato de Malte (MEA), esterilizado a 121 °C, por 15 minutos.

### **2.2.2. Produção da suspensão de esporos**

Para a produção de uma suspensão de esporos de *Byssochlamys nivea*, uma alçada da cultura pura foi transferida para tubo de ensaio contendo caldo nutriente e ativada a 30 °C em uma câmara incubadora tipo B.O.D. por 24 horas até a observação de turbidez no meio. Foram preparadas placas de Petri com ágar extrato de malte (MEA) acrescentando-se 0,1 mL de cultura ativada em cada uma das placas com o MEA solidificado, incubadas a 30 °C por 7 dias em B.O.D. (PITT e HOCKING, 1985).

Após o tempo determinado, cada placa teve sua superfície inundada com cerca de 5 mL de água destilada esterilizada e, com auxílio de alça de Drigalsky, foi realizada a raspagem suave da superfície. O conteúdo foi filtrado em camadas de gaze esterilizada. Foram preparadas placas contendo MEA solidificado e acrescentado, aproximadamente, 0,2 mL do filtrado. Essas placas foram incubadas a 30 °C, por 30 dias, possibilitando a formação dos ascósporos (PITT e HOCKING, 1985).

Após o período de 30 dias, foi verificada a presença de ascósporos, por visualização em microscópio ótico. As células foram recolhidas da superfície, com o auxílio de água destilada esterilizada e agitação suave com uma alça de Drigalsky. Os ascósporos foram separados dos fragmentos miceliares por filtração, utilizando camadas de gaze esterilizada. O conteúdo obtido foi distribuído em tubos Falcon de 15 mL com tampa rosqueável e acrescentado cerca de 9 mL de água destilada esterilizada por tubo. Os tubos contendo a suspensão foram centrifugados 5 vezes, por 15 minutos a 2260 *g* em centrífuga (Excelsa<sup>®</sup> II modelo 206-BL). A cada centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 9 mL de água destilada esterilizada ao *pellet* com posterior homogeneização em vórtex (PITT e HOCKING, 1985).

Ao final das 5 centrifugações todo conteúdo obtido foi ressuspendido em água destilada esterilizada e estocado em tubos de ensaio de 50 mL e mantido a 5 °C (PITT e HOCKING, 1985).

O número de esporos da suspensão-mãe foi obtido por contagem em Câmara de Neubauer a fresco (VICCINI, 2004).

### 2.2.3. Preparo dos esporos de *Byssochlamys nivea*

Após a diluição da suspensão de esporos, observou-se ao microscópio ótico (Bioval) com objetiva de 100x para certificar a existência de esporos livres. O corante utilizado para observação foi a lactofucsina (PITT, 2009; CARMICHAEL, 1955). Para a preparação de lactofucsina foi dissolvido 0,1g de fucsina ácida em 100 mL de ácido láctico. Partes iguais dessa solução foram misturadas com água destilada esterilizada. Essa solução foi estocada em frasco âmbar.

Para a montagem da lâmina a fim de observar os esporos de *Byssochlamys nivea*, uma porção da colônia foi colocada sobre a lâmina de microscópio, e com o auxílio de mais uma agulha de inoculação essa biomassa foi aberta de dentro para fora, de modo que os filamentos se espalhassem para melhor observação. Uma gota de água destilada esterilizada foi colocada sobre a biomassa. Uma micro-gota de corante lactofucsina foi acrescentada sobre a água destilada e, por fim, uma lamínula foi colocada sobre a lâmina.

## 2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estudadas para o suco de laranja inoculado com de ascósporos do fungo filamentoso três variáveis independentes: temperatura (T), pressão (P), e tempo(t) de espera na pressão alvo. Os valores que compuseram o delineamento composto central rotacional (DCCR) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para três variáveis independentes

VARIÁVEIS		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
PRESSÃO (MPa)	X <sub>1</sub>	300,0	340,0	400,0	460,0	500,0
TEMPERATURA (°C)	X <sub>2</sub>	46,6	50,0	55,0	60,0	63,4
TEMPO (minutos)	X <sub>3</sub>	5,0	7,0	10,0	13,0	15,0

Cada tratamento foi uma combinação do tratamento térmico com subsequente tratamento por alta pressão (Tabela 5). A variável resposta foi o número de esporos germinados pelo tratamento combinado entre temperaturas médias e altas pressões. A variável resposta foi expressa em log de N, sendo N o número de esporos germinados.

Tabela 5. Valores codificados e reais da temperatura, pressão e tempo

Tratamento	Temperatura (°C)		Pressão (MPa)		Tempo (min.)	
	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais
1	-1	50	-1	340	-1	7
2	1	60	-1	340	-1	7
3	-1	50	1	460	-1	7
4	1	60	1	460	-1	7
5	-1	50	-1	340	1	13
6	1	60	-1	340	1	13
7	-1	50	1	460	1	13
8	1	60	1	460	1	13
9	- $\alpha$	46,6	0	400	0	10
10	+ $\alpha$	63,4	0	400	0	10
11	0	55	- $\alpha$	300	0	10
12	0	55	+ $\alpha$	500	0	10
13	0	55	0	400	- $\alpha$	5
14	0	55	0	400	+ $\alpha$	15
15	0	55	0	400	0	10
16	0	55	0	400	0	10
17	0	55	0	400	0	10
18	0	55	0	400	0	10
19	0	55	0	400	0	10

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com 19 ensaios, incluindo cinco repetições para o ponto central e duas repetições para os demais ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Após os tratamentos aplicados, as amostras foram plaqueadas em ágar extrato de malte (MEA), em triplicata.

## 2.4. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

### 2.4.1. Fluxograma de trabalho

A Figura 4 representa as etapas da metodologia que foram utilizadas no presente trabalho. Os tratamentos utilizando temperaturas médias e altas pressões e as análises microbiológicas foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos do CCA-UFES-Alegre.

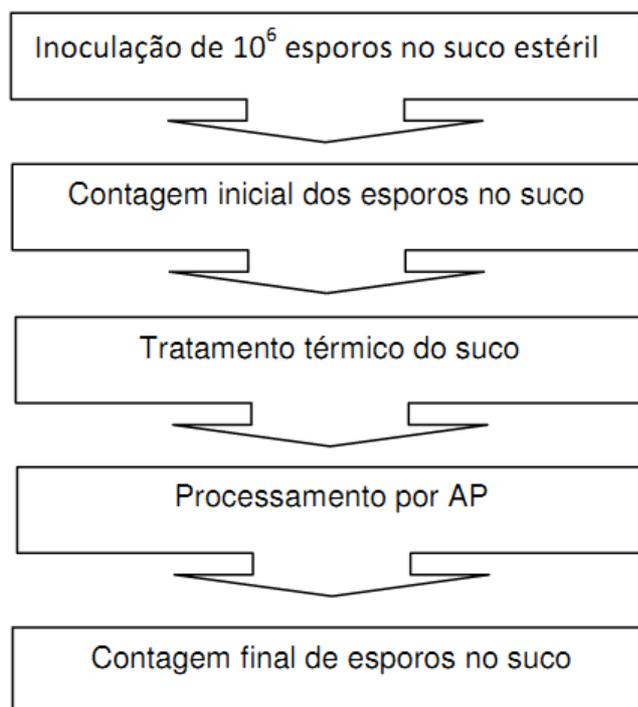


Figura 4. Fluxograma das etapas da metodologia

#### 2.4.2. Preparo do inóculo

Foram realizadas diluições adequadas da suspensão-mãe de esporos em água peptonada 1 % e 0,1 % de Tween<sup>®</sup> 80 (EICHER e LUDWIG, 2002), a fim de se alcançar uma contagem inicial de 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> no suco de laranja antes dos tratamentos. A contagem inicial para o *Byssochlamys nivea* foi realizada em Câmara de Neubauer (VICCINI, 2004).

#### 2.4.3. Pré-Tratamento Térmico

Amostras de suco de laranja, antes de serem submetidas ao tratamento por altas pressões, foram descongeladas e tratadas termicamente com temperaturas que variaram de 46,6 ± 0,1 a 63,4 ± 0,1 °C por 20 minutos em banho termostático com circulação de água (Marconi MA-159), conforme apresentado na Tabela 5.

## 2.4.4. Tratamento por Alta Pressão

### 2.4.4.1. A célula de Alta Pressão

O equipamento de alta pressão, patente BR 20 2012 008174-7, foi desenvolvido pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Espírito Santo.

A Figura 5 mostra o desenho esquemático da célula de pressão.

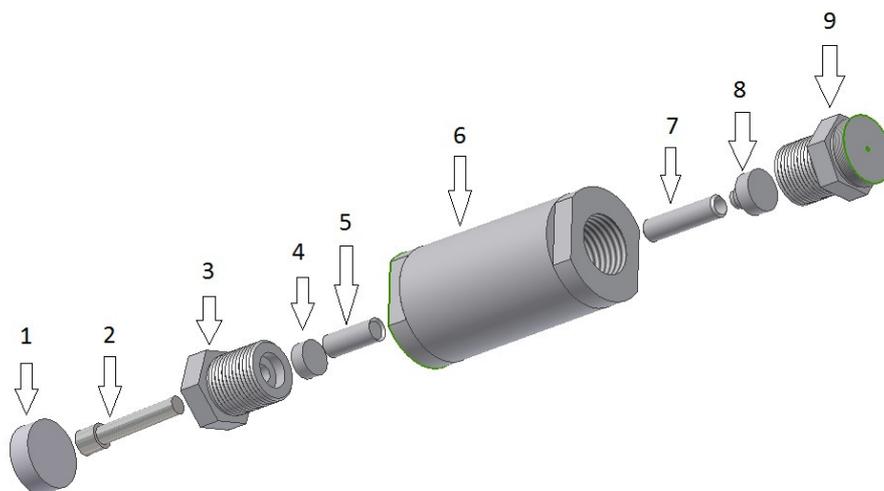


Figura 5. Representação esquemática da célula de pressão.

A fim de submeter o suco aos tratamentos de alta pressão a peça 7 foi carregada com aproximadamente 2,0 mL da amostra de suco de laranja com contagem inicial de esporos conhecida, após passar por tratamento térmico. A peça foi encaixada com a peça 8 para não permitir vazamento de amostra no momento da pressurização. Esse conjunto (peça 7 e peça 8) foi introduzido no corpo da célula (peça 6). Em separado a peça 9 foi introduzida na peça 6 rosqueando no sentido horário até tocar a peça 8 (que se encontra dentro da peça 6). A peça 5 foi também introduzida na peça 6. Dando seguimento, a peça 4 foi introduzida na peça 3, complementando-a. Esse conjunto (peça 4 e 3, na sequência da Figura 5) foi enroscado à peça 6. Por fim a peça 2 foi colocada sobre a peça 3 e na sequência a

peça 1 foi colocada sobre a peça 2. O conjunto montado foi levado à prensa hidráulica manual sobre o qual foi empregada a pressão definida de acordo com o delineamento experimental (Tabela 5).

#### 2.4.4.2. Pressurização do suco

O tratamento do suco por alta pressão foi conduzido colocando-se uma alíquota do suco de 2 mL previamente inoculado com, aproximadamente,  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> e, previamente tratado com a respectiva temperatura de acordo com o delineamento experimental (Tabela 5) na cápsula de pressão e inserida no cilindro para aplicação da pressão. O tratamento por alta pressão foi realizado em duplicata.

Após a subida da pressão até os valores do experimento (300,0; 340,0; 400,0; 460,0 e 500,0 MPa), teve início a marcação do tempo que foram de 5, 7, 10, 13 e 15 minutos, também de acordo com as combinações da Tabela 5. O tempo de espera da amostra na pressão é definido como o tempo à pressão constante, entre o final da compressão e o início da descompressão.

Ao final da aplicação do tratamento, a cápsula contendo o suco foi retirada do cilindro e a amostra tratada foi levada para contagem final do número de esporos.

### 2.5. CONTAGEM FINAL DOS ESPOROS NO SUCO PROCESSADO

As amostras de suco pós-processamento (calor e pressão) foram mantidas em banho de gelo e imediatamente levadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos CCA-UFES-Alegre, diluídas adequadamente em água peptonada 0,1% e 0,1% de Tween<sup>®</sup> 80 e o plaqueamento realizado em profundidade em triplicata. O meio utilizado para contagem foi o ágar extrato de malte (MEA), as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C e a contagem realizada no terceiro e quinto dia (PITT e HOCKING, 1985). Placas contendo 30 a 300 (SILVA et al, 2010) colônias foram consideradas para o cálculo do número final de esporos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SUCO DE LARANJA

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises de caracterização físico-química realizadas nas amostras de suco de laranja variedade Pera.

Observou-se um valor de 10,54 °BRIX para sólidos solúveis, que está de acordo com o PIQ que estabelece mínimo de 10,5 °BRIX (BRASIL, 2000).

Tabela 6. Análises físico-químicas do suco de laranja variedade Pera

Determinações	Média ± DP
pH (28 °C)	3,90±0,01
SST (°BRIX) *	10,54±0,00
ATT** (g ácido cítrico/100mL de suco)	0,64±0,00
Ratio***	6,47±0,00

\*O SST foi determinado a 28 °C e corrigido para 20 °C para comparação com BRASIL (2000) de acordo com IAL

\*\*Acidez total titulável

\*\*\*Quociente entre o SST e ATT

O valor do ratio encontrado foi de 16,47 °BRIX/ % g ácido cítrico e está dentro dos padrões exigidos pela instrução normativa vigente que estabelece o mínimo de 7,00 ° BRIX/% g de ácido cítrico (BRASIL, 2000).

Os parâmetros SST e ATT e SST/ATT (ratio) são indicadores de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do suco de laranja, tanto para a indústria quanto para o suco *in natura* estabelecido por BRASIL (2000).

Em relação ao pH, a Instrução Normativa n°1, de 07 de janeiro de 2000 não estabelece valor mínimo como no Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) (BRASIL, 2000), no entanto o valor encontrado para o suco *in natura* (3,90), no presente trabalho, está dentro do esperado para frutas cítricas que é de 3,40 a 4,00 (OLIVERIA et al., 2006; CORREA-NETO et al., 1999).

Quanto mais avançada a maturação dos frutos maior é o teor de sólidos solúveis e menor a acidez do suco e, conseqüentemente, mais elevado o ratio (SST/ATT) (VOLPE et al., 2002; BENASSI JR, 2001).

### 3.2. OBSERVAÇÃO DOS ESPOROS DE *Byssochlamys nivea*

A Figura 1.3 apresenta os ascósporos livres, após serem centrifugados 5 vezes, por 15 minutos, a 2260g em centrífuga (Excelsa® II modelo 206-BL) observados em microscópio ótico (Bioval).

Pela Figura 6 pode-se observar que os ascósporos estão livres, ou seja, não envolvidos pelos ascos.

O número de esporos na suspensão mãe foi obtido por contagem em Câmara de Neubauer a fresco e a concentração foi de  $7,23 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

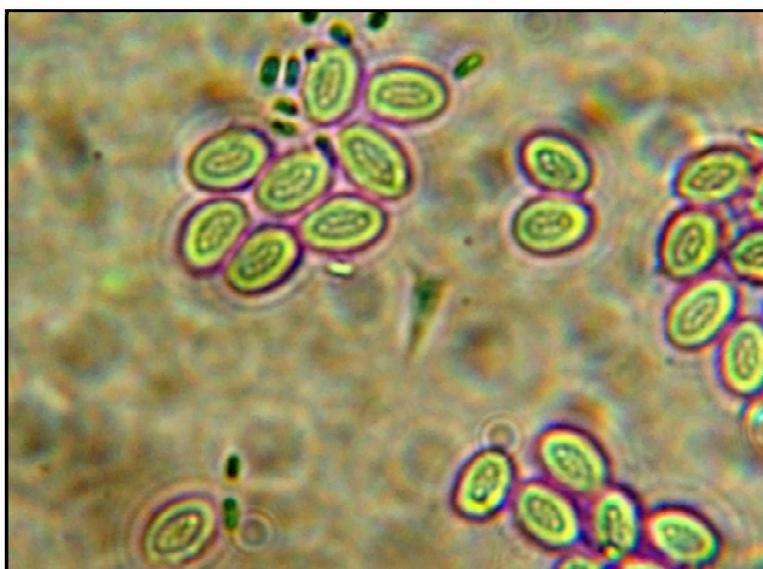


Figura 6. Esporos livres de *Byssochlamys nivea* corados com lactofucsina, observados em microscópio ótico, objetiva de 100 x.

### 3.3. EFEITO DOS TRATAMENTOS NA GERMINAÇÃO ESPOROS DE *Byssochlamys nivea*

A Tabela 7 apresenta a resposta (germinação de esporos) expressa como log de N e os respectivos tratamentos aos quais os esporos foram submetidos.

Conforme as condições utilizadas no processamento do suco, a germinação variou de 3,71 a 5,91 ciclos log a 340 MPa/60 °C/7 minutos e 500 MPa/55 °C/10 minutos, respectivamente. Isto mostra que os tratamentos utilizados foram eficientes para a germinação de ascósporos do fungo. Os pontos centrais apresentam pequena variação, indicando boa repetibilidade do processo (RODRIGUES e IEMMA; 2005).

Tabela 7. Tratamentos, níveis das variáveis independentes (temperatura, pressão, tempo) e número de esporos germinados (log esporos.mL<sup>-1</sup>) de *B. nivea* no suco de laranja após os tratamentos

Tratamento	Temperatura (T) (°C)	Pressão(P) (MPa)	Tempo(t) (min.)	Log N
1	50	340	7	3,97
2	60	340	7	3,71
3	50	460	7	4,43
4	60	460	7	4,34
5	50	340	13	4,03
6	60	340	13	3,92
7	50	460	13	4,50
8	60	460	13	4,30
9	46,6	400	10	4,26
10	63,4	400	10	4,10
11	55	300	10	3,74
12	55	500	10	5,91
13	55	400	5	4,14
14	55	400	15	4,26
15	55	400	10	4,22
16	55	400	10	4,15
17	55	400	10	4,19
18	55	400	10	4,15
19	55	400	10	4,18

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 7), as variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram: o efeito linear e quadrático da pressão, o efeito linear e quadrático da temperatura, o efeito linear e quadrático do tempo e a interação entre a pressão linear e o tempo linear para a germinação de ascósporos de *B. nivea* em suco de laranja.

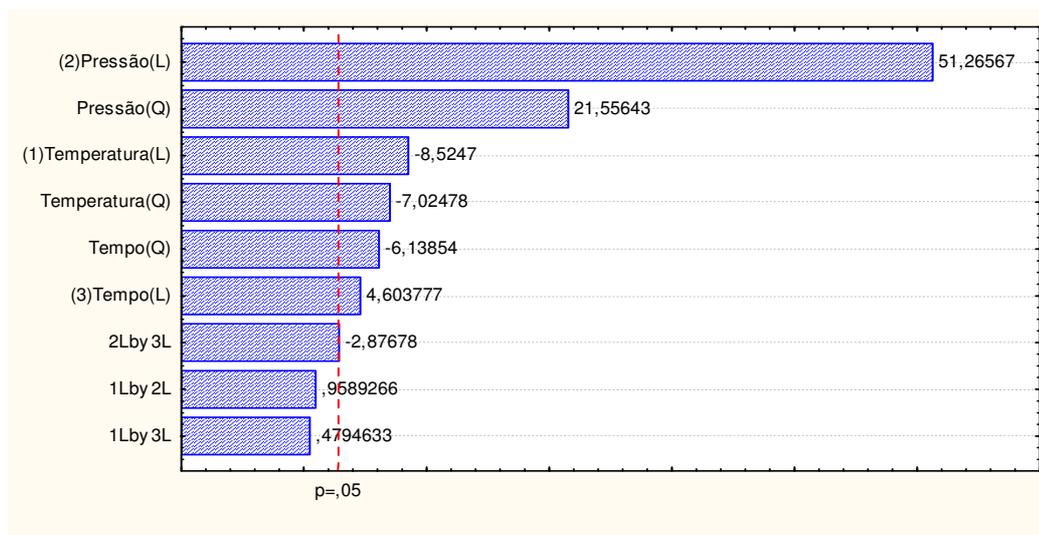


Figura 7. Gráfico de Pareto para efeitos lineares e quadráticos de pressão, temperatura e tempo e as respectivas interações sobre a germinação dos esporos de *Byssochlamys nivea* em suco de laranja.

A Tabela 8, a seguir, apresenta os coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) da regressão para o modelo polinomial da germinação de ascósporos de *B. nivea*, em suco de laranja.

Tabela 8. Coeficientes da regressão e modelo polinomial para germinação de ascósporos de *Byssochlamys nivea*

Parâmetros	Coefficiente Estimado	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Erro padrão	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%	F-valor	p-valor
Intercepto	4,18864	-	-	0,0131	4,1520	4,2252	-	0,0000
T	-0,06807	0,06322	1	0,0079	-0,180	-0,091	72,670	0,0010
T <sup>2</sup>	-0,05616	0,04293	1	0,0079	-0,156	-0,067	49,348	0,0021
P	0,40935	2,28650	1	0,0079	0,7743	0,8630	2628,1	0,0000
P <sup>2</sup>	0,17236	0,40427	1	0,0079	0,3003	0,3891	464,68	0,0000
t	0,03676	0,01843	1	0,0079	0,0291	0,1178	21,195	0,0100
t <sup>2</sup>	-0,04908	0,03278	1	0,0079	-0,142	-0,053	37,682	0,0035
P*t	-0,03000	0,00720	1	0,0104	-0,118	-0,002	37,682	0,0451

A equação gerada para o efeito dos termos significativos em relação à germinação de ascósporos de *Byssochlamys nivea* é:

$$\text{Germinação} = 4,19 - 0,07 T - 0,06 T^2 + 0,41 P + 0,17 P^2 + 0,04 t - 0,05 t^2 - 0,03 Pt \quad (1)$$

O coeficiente de determinação da equação ( $R^2$ ) = 0,80 para o modelo foi válido, indicando que ele explica 80% da variação dos dados observados.

Conforme Scarminio e Bruns (2001), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mede a proporção da variação total da resposta que é explicada pelo modelo. Assim, quanto mais próximo de 1 ou 100% o coeficiente de determinação estiver, melhor o ajuste dos dados ao modelo. Ainda de acordo com Scarminio e Bruns (2001), modelos com ( $R^2$ )>0,60 podem ser usados para fins preditivos. De acordo com o modelo polinomial e com o gráfico de Pareto (Figura 7), o fator que mais contribuiu para o aumento da germinação de esporos de *B. nivea* foi a pressão linear.

Ferreira (2009) determinou que as condições ideais para a ativação dos esporos de *B. nivea* pelo calor foram de 80 °C, por 5 minutos, em néctar e suco concentrado de abacaxi, e de 10 minutos em suco integral, isso confirma a necessidade de elevadas temperaturas para a ativação do *B. nivea*. É válido observar que, no presente trabalho, as temperaturas, tanto linear quanto quadrática que compõem o modelo possuem coeficientes negativos, isso mostra que as temperaturas nas faixas utilizadas para o modelo gerado contribuem de forma a diminuir a germinação dos esporos de *B. nivea*. Isso sugere que deve haver mecanismos diferentes para a germinação de esporos de *B. nivea* com aplicação de temperatura e com aplicação de pressão.

Eicher e Ludwig (2002) submetem ascósporos de *Eurotium repens* 1 hora a 200 MPa e 25 °C e a porcentagem de germinação foi de apenas 8 % do total inicial de ascósporos. No presente trabalho, o uso da pressão de 340 MPa foi possível germinar 65,3% dos esporos de *B. nivea* e, usando 500 MPa por 10 minutos e 55 °C foi possível germinar 99 % da contagem inicial de esporos de *B. nivea*. Dessa forma, pode-se concluir que a taxa de germinação pode variar de acordo com a espécie.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 8), a seguir, mostra que à medida que a pressão de trabalho aumentou houve aumento da germinação final de esporos.

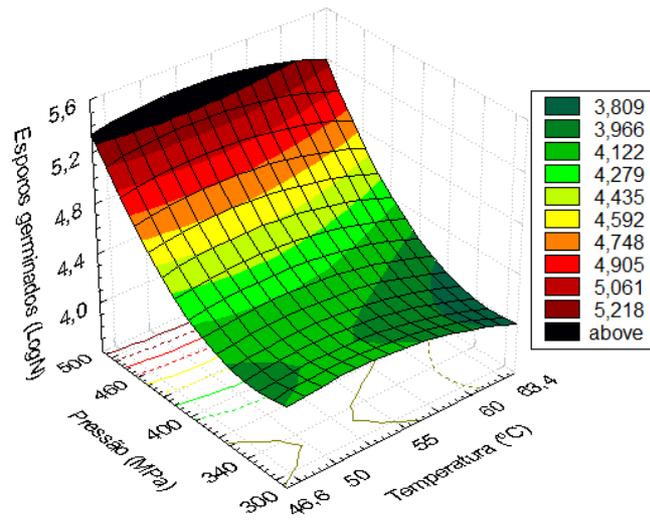


Figura 8. Gráfico de superfície de resposta do log de N (germinação) de ascósporos de *Byssochlamys nivea* em suco de laranja em relação à temperatura (°C) e a pressão (MPa).

#### 4. CONCLUSÃO

O modelo polinomial proposto explicou 80% da variação dos dados observados. As variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram: o efeito linear e quadrático da pressão, o efeito linear e quadrático da temperatura, o efeito linear e quadrático do tempo e a interação entre a pressão linear e o tempo linear.

O efeito da temperatura linear e quadrática foi menos significativo ( $p < 0,05$ ) do que o efeito da pressão.

O efeito do tempo linear e quadrático também foi menos significativo ( $p < 0,05$ ) do que os efeitos da pressão.

A interação entre a pressão linear e a tempo linear também foi significativa ( $p < 0,05$ ).

A pressão linear e a pressão quadrática foram as variáveis que mais contribuíram para a germinação dos esporos de *B. nivea*, de maneira que a 300 MPa foi possível germinar 3,71 ciclos log e a 500 MPa foi possível germinar 5,91 ciclos log esporos.mL<sup>-1</sup>.

Isso mostra o potencial da utilização de alta pressão para induzir a germinação de esporos de *B. nivea* no suco de laranja.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENASSI JR., M. *Determinação das curvas de maturação das variedades cítricas (Citrus sinensis L. Osbeck) Pera-rio, Natal, Valência e Hamlin*. 2001. 137p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº1 de 07 de janeiro de 2000. Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. *Diário oficial da República Federativa. Brasília (DF), 10 de janeiro de 2000*.
- BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T; TAUSCHER, B. High Pressure Inactivation of *Byssochlamys nivea* Ascospores and Other Heat Resistant Moulds. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 29, p. 404–410, 1996.
- CARMICHAEL, J. Lacto-fuchsin: a new medium for mounting fungi. In: *Mycology*, 1955
- CORRÊA-NETO, R.S.; FARIA. J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 1, p. 153-160, 1999.
- DANTIGNY, P.; DAO, T.; DEJARDIN, J.; BENSOUSSAN, M. Effect of ethanol vapours on inactivation of fungal spores. In: Nychas, G.J.E., Taoukis, P., Koutsoumanis, K., Van Impe, J., Geeraerd, A. (Eds.), *Proceedings of the 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods*. InAthens, Greece, p. 257–260. 16–19, 2007.
- EICHER R.;LUDWIG, H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 131, p. 595–604, 2002.
- FERREIRA, E.H.R. *Avaliação da barorresistência e da termorresistência de Byssochlamys nivea em néctar e suco integral de abacaxi*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- FERREIRA, E.H.R.; ROSENTHAL, A.; CALADO, V.; SARAIVA, J.; MENDO, S. *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *Journal of Food Engineering*, v. 95, p. 664–669, 2009.
- HOSOYA, K.; NAKAYAMA, M.; MATSUZAWA, T.; IMANISHI Y.; HITOMI, J.; Yaguchi, T. Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssochlamys*. *Food Control*, v. 26, p. 169-173, 2012.
- IAL. In: Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brasília: 4ª ed. ANVISA. 2005.
- MAGAN, N., OLSEN, M.. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing, United Kingdom. 2004.

OLIVEIRA, J.C.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K.A.G.; SANTOS, A.C.; MIGUEL, M.A.L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2): 241-245, 2006.

PEREIRA, M.F.F.C.; GUTIERREZ, N.; ALMEIDA, G. (2006). Procedimentos pós-colheita na produção integradas de Citros. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Disponível em: <[www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento\\_156.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento_156.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2013.

PITT, J.I. Fungi and Food Spoilage. New York, p.19-52: 4ª ed. Ed. Springer, 2009.

PITT, J.I. e HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Sydney, p. 413, 1985.

RODRIGUES, M. e IEMMA, A. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas, Editora Casa do Pão. 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4ª ed. São Paulo, Editora Varela, 624p., 2010.

SPLITTSTOESSER, D.F. Fruits and fruit products. In: Beuchat LR. (ed), Food and beverage mycology, 2nd ed.: 101–128. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 1987.

VICCINI, G. (2004). *Otimização da produção de esporos do fungo Clonostachys rosea – um biopesticida para a cultura do morangueiro*. Curitiba, PR: Dissertação (Mestrado em Ciências: Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná.

VOLPE, C.A.; SCHÖFFEF, E.R.; BARBOSA, J.C. Influência da soma térmica e da chuva durante o desenvolvimento de laranjas 'Valência' e 'Natal' na relação entre sólidos solúveis e acidez e no índice tecnológico do suco. *Rev. Bras. Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 436-441, 2002.

WUYTACK, E.Y.; MICHIELS, C.W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 333–341, 2001.



## **CAPÍTULO II**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO E TEMPERATURAS MÉDIAS NA GERMINAÇÃO DE  
ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SUCO DE LARANJA INTEGRAL**

## RESUMO

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Efeito da alta pressão e temperaturas médias na germinação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja integral. 2013.** Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo Alegre, ES. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Vieira de Carvalho. Co-orientador: Prof. Dr. Wilmer Edgar Luera Peña.

*Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria muito importante para a indústria de sucos devido ao seu potencial deteriorante. A espécie produz esporos altamente termoacidófilos que, além de sobreviver aos tratamentos de alta temperatura, podem ter seus esporos germinados devido ao calor, levando a deterioração precoce dos sucos, causando perdas para o setor. A indução da germinação de esporos de *A. acidoterrestris* antes do tratamento com calor pode ser um método eficaz para inativar as bactérias e levar a esterilidade nos sucos. Neste trabalho, a germinação de esporos de *A. acidoterrestris* foi determinada em suco de laranja integral (pH=3,9) com um tratamento de pré-aquecimento (T), que variou de 46,6 a 63,4 °C (20 minutos), a pressão (P) de 300 a 500 MPa, e tempo (t) de retenção variou de 5 a 15 minutos. O delineamento composto central rotacional (DCCR) com três fatores (T, P e t) e metodologia de superfície de resposta foram usados para estudar a taxa de germinação de esporos em suco de laranja integral. Um modelo matemático foi proposto para avaliar a influência dos parâmetros (T, P e t) sobre a germinação dos esporos. A pressão, a temperatura e o tempo foram significativos para germinação de esporos. A temperatura foi o fator que mais contribuiu para a germinação dos esporos. Não houve interação entre os fatores. Foi possível germinar 0,66 ciclos log da contagem inicial de esporos, utilizando 55 °C e 500 MPa por 10 minutos. Germinações superiores (1,63-1,69 ciclos log) foram possíveis empregando 63,4 °C/400MPa/10 minutos e 60 °C/360 MPa/13 minutos, respectivamente. Este trabalho mostra o potencial do uso de temperaturas moderadas para germinação de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja integral antes do tratamento térmico.

Palavras-chave: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, esporos, alta pressão, temperaturas médias, ativação, suco de laranja

## ABSTRACT

FERREIRA, Glaucia Aparecida Mataveli. **Effect of high pressure and average temperatures in the germination of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange whole juice.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology) Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Vieira de Carvalho. Coadvisor: Prof. Dr. Wilmer Edgar Luera Peña.

*Alicyclobacillus acidoterrestris* is very important for the juice industry because of its potential deteriorating. The species produces spores highly thermoacidophiles that besides surviving the high temperature treatments can have their spores germinated due to heat, leading to early deterioration of the juices causing losses to the industry. The induction of germination of *A. acidoterrestris* spores before heat treatment can be an efficient method to inactivate the bacteria and lead to sterility in juices. In this work, the germination of *A. acidoterrestris* spores was determined in whole orange juice (pH = 3.9) with pre-heat treatment (T) ranging from 46.6 to 63.4 ° C (for 20 minutes), pressure (P) of 300 to 500 MPa and time (t) of retention ranging from 5 to 15 minutes. Central composite rotational design (CCRD) with three factors (T, P and t) and response surface methodology were used to study the rate of germination of endospores in orange juice. A mathematical model was proposed to evaluate the influence of the parameters (T, P, and t) on spore germination. The pressure, temperature and time were significant ( $p < 0,05$ ) at the rate of spore germination. Temperature was the main factor that contributes to spore germination. There was no interaction between the factors. It was possible to germinate 0.66 log cycles of initial spore count, using 55 °C and 500 MPa for 10 minutes. Germinations higher (1.63 to 1.69 log cycles) were possible using 63,4 °C/400MPa/10 minutes and 60 °C/360 MPa/13 minutes, respectively. This work shows the potential of using moderate temperatures for germination of spores of *A. acidoterrestris* in whole orange juice before heat treatment.

Keywords: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, spores, high pressure, activation, orange juice.

## 1. INTRODUÇÃO

*Alicyclobacillus* é um gênero de grande preocupação para a indústria de alimentos. Devido à sua natureza termo-acidofílica, há cada vez mais relatos da presença de espécies do gênero em alimentos ácidos à base de frutas como sucos, polpas e purês (STEYN et al., 2011).

De acordo com Smith et al. (2010), este gênero é composto por bactérias aeróbias estritas, acidófilas, termofílicas e formadoras de esporos, chamada de TAB (“Thermo-tolerant Acidophilic Bacilli ou Bacteria”). De acordo com os mesmos autores, sua forma é bacilar (0,3 a 0,8  $\mu\text{m}$  x 2 a 4,5  $\mu\text{m}$ ) e são gram-positivos. Requerem temperaturas elevadas (40 a 70  $^{\circ}\text{C}$ ) e as condições de pH baixo (2-6) para o desenvolvimento (IFU, 2004).

De todas as espécies do gênero, *Alicyclobacillus acidoterrestris* é a de maior impacto sobre a indústria de sucos. A presença de 1 a 10 esporos por mL de suco é suficiente para causar deterioração (STEYN et al., 2011).

A tolerância mundial no que diz respeito à presença de *Alicyclobacillus* é variável, no entanto, aproximadamente 62% dos países importadores exigem sua ausência (OTEIZA, 2011).

Por serem micro-organismos de difícil controle, pesquisas têm sido realizadas mostrando que inativação pode ser facilitada quando são utilizados dois ou mais tratamentos (VERCAMENN et al., 2012). O primeiro tratamento é dado a fim de levar os esporos a germinar e no segundo, um tratamento é dado para inativar os esporos germinados (EICHER e LUDWIG, 2002).

Em particular, pouco se sabe sobre a ativação e germinação de esporos induzidas por alta pressão sob diferentes condições de processamento em alimentos. Esta é uma questão relevante porque a inativação de esporos por alta pressão, à temperatura moderada, é dependente da ativação da germinação (WUYTACK e MICHIELS, 2001).

O objetivo desse trabalho foi estudar os níveis de germinação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* submetidos à temperatura que variam de 46,6 a 63,4  $^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, seguidos de tratamentos de alta pressão que variam de 300 a 500 MPa, por tempos de 5 a 15 minutos.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. SUCO DA LARANJA**

#### **2.1.1. Obtenção**

Foram adquiridas laranjas da variedade Pera, do mercado varejista no município de Guaçuí, no mês de março de 2012. As laranjas foram provenientes do estado de São Paulo.

Os frutos foram lavados em água corrente e submersos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm por 30 minutos, foram posteriormente cortados ao meio e o suco foi obtido utilizando extrator de frutas, totalizando cerca de 2,0 L de suco *in natura* integral.

Amostras de suco foram distribuídas em tubos Falcon (15 mL) e esterilizadas a 100 °C, por 10 minutos, em autoclave. Após resfriamento foram congeladas até o uso.

#### **2.1.2. Análises físico-químicas**

##### **2.1.2.1. Determinação dos sólidos solúveis totais (SST)**

A concentração de sólidos solúveis totais foi determinada por refratometria usando refratômetro de bancada do tipo ABBE, conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), em triplicata.

##### **2.1.2.2. Avaliação do pH**

Foi determinado o pH do suco de laranja com potenciômetro digital (Marconi PA-200), em triplicata, de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

##### **2.1.2.3. Acidez total titulável**

A acidez total titulável foi determinada por titulometria utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 M e indicador fenolftaleína, de acordo com a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), em triplicata, e expressa em gramas de ácido cítrico por 100 mL de suco.

Amostras de 10 mL de suco de laranja foram diluídas em 100 mL de água destilada e foram adicionados 0,3 mL de indicador fenolftaleína. Essa mistura foi titulada com hidróxido de sódio 0,1 M, sob agitação constante até o aparecimento da cor rósea persistente por 30 segundos.

#### 2.1.2.4. Cálculo do Ratio

O valor de ratio pode indicar a palatabilidade de sucos de fruta. Quanto maior o valor do ratio mais doce é a fruta (PEREIRA et al., 2006). Esse índice faz parte do padrão de identidade qualidade (PIQ) dos sucos de frutas de acordo com a Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Esse valor é utilizado nas indústrias de alimentos para identificar o grau de maturação da fruta. É um importante indicador para a produção de sucos cítricos. A acidez titulável diminui com o amadurecimento, o teor de sólidos solúveis aumenta, de maneira que quanto mais madura a fruta maior o valor do ratio, ou seja, maior o teor de sólidos solúveis e menor acidez titulável.

O valor do ratio foi obtido pelo cálculo do quociente entre o SST (sólidos solúveis totais) dado em °Brix e a acidez total titulável. Para alimentos cítricos como o suco de laranja, o valor é expresso em gramas de ácido cítrico por 100 mL de suco.

## 2.2. PREPARO DE ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris*

### 2.2.1. Cepa utilizada e meios de cultivo e de quantificação

Foi utilizada a cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DMS 2498, mantida a 5 °C em água destilada esterilizada em pérolas de vidro, do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo-Alegre.

Os seguintes meios de cultivos foram utilizados:

- Para esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius medium* (AAM): 0,05 % de  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ ; 1,5 % de Agar; 1,0 g de extrato de levedura; 0,2 g de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,25g de  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ ; 0,60g de  $KH_2PO_4$ ; 1,0 g de glicose; 1,0 L de água esterilizada a 121 °C por 15 minutos. O pH foi ajustado para 4,0 com  $H_2SO_4$  1N (MURAKAMI et al., 1998).

- Para quantificação do *A. acidoterrestris* foi utilizado o meio K: 5g de Peptona; 1g de Glicose; 2,5 g de Extrato de levedura; 1,0 g de Tween 80; 15,0 g de Agar; 1,0 L de Água destilada. O meio foi esterilizado a 121 °C, por 15 minutos. O pH foi ajustado para 3,7 com ácido málico 25% esterilizado em autoclave (WALLS e CHUYATE, 1998).

### **2.2.2. Produção da suspensão de esporos**

Inicialmente, foi realizada a pré-esporulação de *A. acidoterrestris* em tubos inclinados contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar, pH=5,6), incubados a 44 °C, por 3 dias (PONTIUS, 1998). As células crescidas foram recolhidas pela raspagem com bastão de vidro esterilizado, utilizando 5 mL de água destilada esterilizada, por tubo.

A suspensão obtida foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado e submetida a 80 °C, por 10 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo. Alíquotas de 0,1mL da suspensão ativada foram inoculadas em placas de Petri contendo AAM solidificado. As placas inoculadas foram incubadas por 9 dias, a 45 °C.

A coleta dos esporos nas placas foi realizada após a observação microscópica de 90 % do campo esporulado, via coloração de esporos com corante verde malaquita (MURAKAMI et al., 1998). Os esporos foram coletados com o auxílio de alça de Drigalski e água destilada esterilizada. Após a coleta, foram lavados e ressuspensos em água destilada esterilizada. Foram feitas 6 centrifugações a 2660 g, por 15 minutos, em centrífuga (Excelsa® II modelo 206-BL). Antes de cada centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 9 mL de água destilada esterilizada com posterior homogeneização em vórtex.

### 2.2.3. Preparo dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Para verificar a presença de esporos de *A. acidoterrestris* foi feita a montagem da lâmina com esporos corados, por verde malaquita 5%, e contracorado com safranina 0,5%. Para coloração dos esporos de *A. acidoterrestris* foi usado o método de Wirtz-Conklin. Primeiro foi realizado um esfregaço fixado pelo calor e sobre ele foram acrescentadas gotas da solução de verde malaquita 5%, esse corante foi fixado à quente durante 3 a 6 minutos. O excesso de corante foi lavado em água corrente e gotas da solução aquosa de safranina, a 5%, foram acrescentadas e o conjunto levado à chama do bico de Bunsen por 0,5 a 1 minuto. Após esses procedimentos, a lâmina foi lavada em água corrente e colocada para secar à temperatura ambiente. Uma lamínula foi colocada sobre a montagem e observada em microscópio ótico. Com o método de coloração os esporos coraram-se de verde, enquanto as células vegetativas bacterianas e detritos coraram-se de vermelho.

A suspensão de esporos foi distribuída em tubos de ensaios de vidro e mantida a 5 °C até o uso.

A contagem inicial do número de esporos na suspensão-mãe foi realizada em meio K, após ativação térmica a 80 °C por 10 minutos e plaqueamento em profundidade. As placas invertidas foram incubadas a 43 °C por 3 dias (WALLS, 1998).

### 2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estudadas para o suco de laranja inoculado com esporos bacterianos de *A. acidoterrestris* três variáveis independentes: temperatura (T), pressão (P), e tempo (t) de espera na pressão alvo. Os valores que compuseram o delineamento composto central rotacional (DCCR) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores utilizados no DCCR para três variáveis independentes

VARIÁVEIS		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
PRESSÃO (MPa)	X <sub>1</sub>	300,0	340,0	400,0	460,0	500,0
TEMPERATURA (°C)	X <sub>2</sub>	46,6	50,0	55,0	60,0	63,4

TEMPO (minutos)	X <sub>3</sub>	5,0	7,0	10,0	13,0	15,0
-----------------	----------------	-----	-----	------	------	------

Cada tratamento foi uma combinação do tratamento térmico com subsequente tratamento por alta pressão. A variável resposta é o número de esporos germinados pelo tratamento combinado entre temperaturas médias e altas pressões (Tabela 10).

Tabela 10. Valores codificados e reais da temperatura, pressão e tempo

Tratamento	Temperatura (°C)		Pressão (MPa)		Tempo (min.)	
	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais	Valores codificados	Valores reais
1	-1	50	-1	340	-1	7
2	1	60	-1	340	-1	7
3	-1	50	1	460	-1	7
4	1	60	1	460	-1	7
5	-1	50	-1	340	1	13
6	1	60	-1	340	1	13
7	-1	50	1	460	1	13
8	1	60	1	460	1	13
9	-α	46,6	0	400	0	10
10	+α	63,4	0	400	0	10
11	0	55	-α	300	0	10
12	0	55	+α	500	0	10
13	0	55	0	400	-α	5
14	0	55	0	400	+α	15
15	0	55	0	400	0	10
16	0	55	0	400	0	10
17	0	55	0	400	0	10
18	0	55	0	400	0	10
19	0	55	0	400	0	10

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com 19 ensaios, incluindo cinco repetições para o ponto central e duas repetições para os demais ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Após os tratamentos aplicados, as amostras foram plaqueadas em meio K, em triplicata.

#### 2.4. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

### 2.4.1. Fluxograma de trabalho

A Figura 9 apresenta as etapas da metodologia que foram utilizadas no presente trabalho. Os tratamentos utilizando temperaturas médias e altas pressões e as análises microbiológicas foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos do CCA-UFES-Alegre.

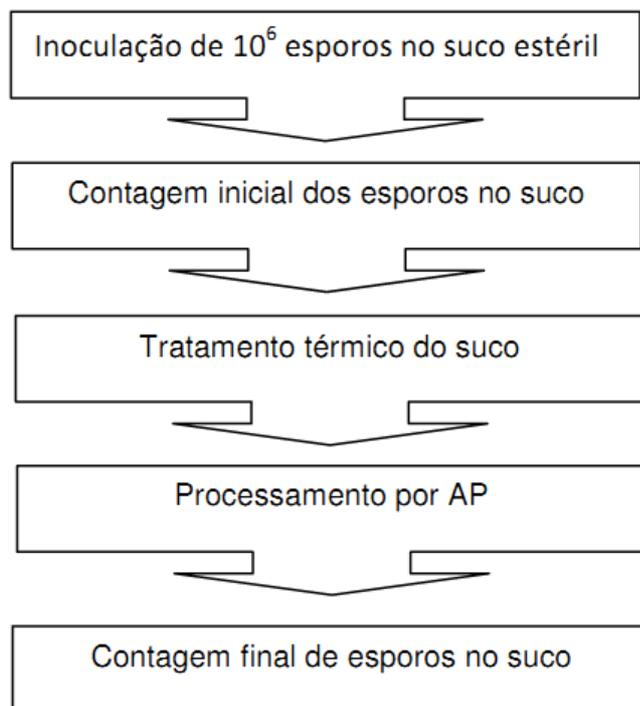


Figura 9. Fluxograma das etapas da metodologia.

### 2.4.2. Preparo do inóculo

Foram realizadas diluições adequadas da suspensão-mãe de esporos em água peptonada 1% e 0,1% de Tween<sup>®</sup> 80, a fim de se alcançar uma contagem inicial de 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> no suco de laranja, antes dos tratamentos. A contagem inicial para o *A. acidoterrestris* foi feita em meio K após ativação dos esporos a 80 °C/10 minutos, o plaqueamento realizado em profundidade e as placas de Petri, invertidas e incubadas a 43 °C por 3 dias. As contagens foram feitas no terceiro dia e conferidas no quinto dia, para certificar que não houve aparecimento de mais colônias (WALLS e CHUYATE, 1998).

### 2.4.3. Pré-Tratamento Térmico

Amostras de suco de laranja, antes de serem submetidas ao tratamento por altas pressões, foram descongeladas e tratadas termicamente com temperaturas que variaram de  $46,6 \pm 0,1$  a  $63,4 \pm 0,1$  °C (Tabela 2.2), por 20 minutos em banho termostático com circulação de água (Marconi MA-159).

### 2.4.4. Tratamento por Alta Pressão

#### 2.4.4.1. A célula de Alta Pressão

O equipamento de alta pressão foi desenvolvido pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Espírito Santo.

A Figura 10 mostra o desenho esquemático da célula de pressão.

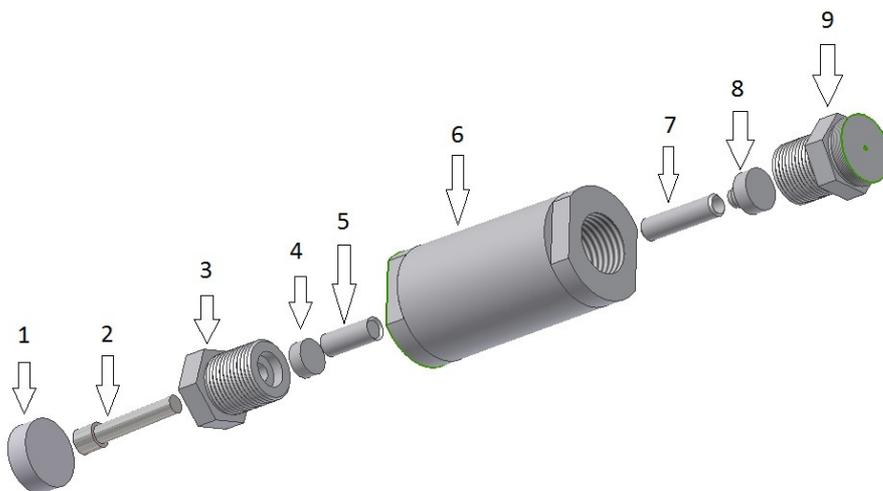


Figura 10. Representação esquemática da célula de pressão.

A fim de submeter o suco aos tratamentos de alta pressão a peça 7 foi carregada com aproximadamente 2,0 mL da amostra de suco de laranja com contagem inicial de esporos conhecida, após passar por tratamento térmico. A peça foi encaixada com a peça 8 para não permitir vazamento de amostra no momento da

pressurização. Esse conjunto (peça 7 e peça 8) foi introduzido no corpo da célula (peça 6). Em separado a peça 9 foi introduzida na peça 6 rosqueando no sentido horário até tocar a peça 8 (que se encontra dentro da peça 6). A peça 5 foi também introduzida na peça 6. Dando seguimento, a peça 4 foi introduzida na peça 3, complementando-a. Esse conjunto (peça 4 e 3), na sequência da Figura 10 foi enroscado à peça 6. Por fim a peça 2 foi colocada sobre a peça 3 e na sequência a peça 1 foi colocada sobre a peça 2. O conjunto montado foi levado à prensa hidráulica manual sobre o qual foi empregada a pressão definida de acordo com o delineamento experimental (Tabela 10).

#### 2.4.4.2. Pressurização do suco

O tratamento do suco por alta pressão foi conduzido colocando-se uma alíquota do suco (2 mL) previamente inoculado com  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> e tratado com a respectiva temperatura, de acordo com o delineamento experimental (Tabela 10). Essa amostra foi inserida na cápsula de pressão, a qual foi inserida no cilindro para aplicação da pressão, conforme item 2.4.4.1. O tratamento por alta pressão foi realizado em duplicata.

Após a subida da pressão, até os valores do experimento (300; 340,0; 400,0; 460,0 e 500 MPa), teve início a marcação do tempo que foram de 5, 7, 10, 13 e 15 minutos. O tempo de espera da amostra na pressão é definido como o tempo à pressão constante entre o final da compressão e o início da descompressão.

Ao final da aplicação do tratamento, a cápsula contendo o suco foi retirada do cilindro e a amostra tratada foi levada para contagem do número de esporos.

## 2.5. CONTAGEM FINAL DOS ESPOROS NO SUCO PROCESSADO

As amostras de suco pós-processamento (calor e pressão) foram mantidas em banho de gelo e imediatamente levadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos CCA-UFES-Alegre. Essas amostras foram submetidas a 80 °C, por 10 minutos, segundo a metodologia descrita por Kalchayananda et al., (2007) para ativar os esporos que não foram induzidos a germinar pelo tratamento empregado.

As amostras foram devidamente diluídas em água peptonada 1% e 0,1% de Tween<sup>®</sup> 80, para evitar a formação de aglomerados, e plaqueadas em meio K. O

plaqueamento foi feito em profundidade e em triplicata. As placas foram invertidas e incubadas a 43 °C e as contagens realizadas no terceiro dia e conferidas no quinto dia (WALLS e CHUYATE, 1998).

Placas contendo 30 a 300 colônias foram consideradas para o cálculo do número final de esporos (SILVA et al, 2010).

O resultado encontrado para o número de esporos germinados por altas pressões (N) durante o tratamento aplicado foi obtido pela subtração do número inicial de esporos pela contagem, após tratamento de pressão e tratamento térmico (80 °C/10min) (VERCAMMEN et al., 2012; KALCHAYANAND et al., 2007). O resultado foi expresso em log N.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DO SUCO DE LARANJA

Na Tabela 11 são apresentados os resultados das análises de caracterização físico-química realizadas nas amostras de suco de laranja variedade Pera.

Tabela 11. Análises físico-químicas do suco de laranja variedade Pera

Determinações	Média ± DP
pH (28 °C)	3,90±0,01
SST (°BRIX) *	10,54±0,00
ATT** (g ácido cítrico/100mL de suco)	0,64±0,00
Ratio***	16,47±0,00

\*O SST foi determinado a 28 °C e corrigido para 20 °C para comparação com BRASIL (2000) de acordo com IAL

\*\*Acidez total titulável

\*\*\*Quociente entre o SST e ATT

Observou-se um valor de 10,54 °BRIX para sólidos solúveis, que está de acordo com o PIQ que estabelece mínimo de 10,5 °BRIX (BRASIL, 2000).

O valor do ratio encontrado foi de 16,47 °BRIX/ % g ácido cítrico e está dentro dos padrões exigidos pela instrução normativa vigente que estabelece o mínimo de 7,00 °BRIX/% g ácido cítrico (BRASIL, 2000).

Os parâmetros SST e ATT e SST/ATT (ratio) são indicadores de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do suco de laranja, tanto para a indústria quanto para o suco *in natura*, estabelecido por BRASIL (2000).

Em relação ao pH, a Instrução Normativa nº1, de 07 de janeiro de 2000 não estabelece valor mínimo como no Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) (BRASIL, 2000), no entanto, o valor encontrado para o suco *in natura* (3,90), no presente trabalho, está dentro do esperado para frutas cítricas que é de 3,40 a 4,00 (OLIVERIA et al., 2006; CORREA-NETO et al., 1999).

Quanto mais avançada a maturação dos frutos maior é o teor de sólidos solúveis e menor a acidez do suco e, conseqüentemente, mais elevado o ratio (SST/ATT) (VOLPE et al., 2002; BENASSI JR, 2001).

### 3.2. OBSERVAÇÃO DOS ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

A Figura 11 apresenta os esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* da suspensão-mãe, corados com cor verde malaquita 5%, e contracorado safranina 0,5%.

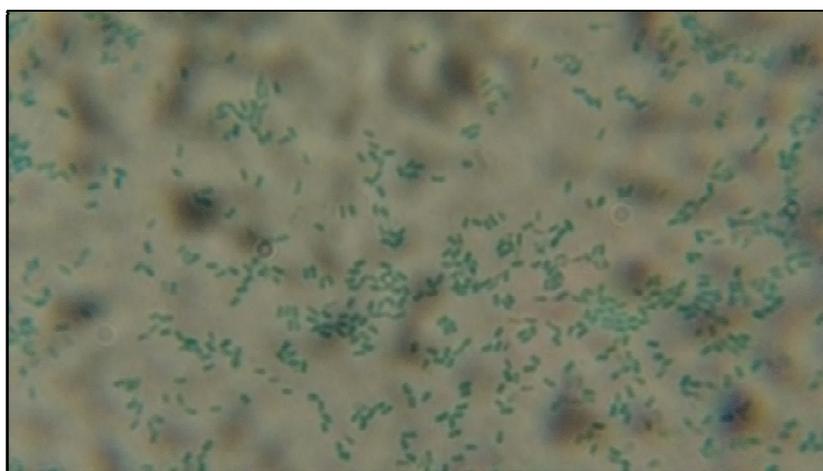


Figura 11. Esporos *Alicyclobacillus acidoterrestris* DMS 2498 corados com verde malaquita, observados em microscópio ótico, objetiva de 100x.

Foi possível observar a forma bacilar dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e a ampla esporulação, já que não se observa células contracoradas com safranina.

O número de esporos na suspensão-mãe obtido por plaqueamento em meio K foi de  $2,4 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3. EFEITO DA PRESSÃO E DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A Tabela 12 apresenta o resultado da germinação de esporos de *A. acidoterrestris* expressa como o log de N e os respectivos tratamentos aos quais eles foram submetidos.

Conforme as condições utilizadas no processamento do suco, a germinação variou entre 0,66 a 1,69 ciclos log quando foram utilizados os tratamentos de 500 MPa/55 °C/10 minutos e 340 MPa/60 °C/13 minutos, respectivamente. Os pontos centrais apresentaram pequena variação, indicando boa repetibilidade dos tratamentos (RODRIGUES e IEMMA; 2005).

Tabela 12. Tratamentos, níveis das variáveis independentes (temperatura, pressão, tempo) e número de esporos germinados (log esporos.mL<sup>-1</sup>) de *A. acidoterrestris* no suco de laranja após os tratamentos

Tratamento	Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Tempo (min.)	Log N
1	50	340	7	1,26
2	60	340	7	1,26
3	50	460	7	1,26
4	60	460	7	1,48
5	50	340	13	1,24
6	60	340	13	1,69
7	50	460	13	1,32
8	60	460	13	1,45
9	46,6	400	10	1,51
10	63,4	400	10	1,63
11	55	300	10	1,28
12	55	500	10	0,66
13	55	400	5	0,97
14	55	400	15	0,99
15	55	400	10	1,30
16	55	400	10	1,24
17	55	400	10	1,41
18	55	400	10	1,40
19	55	400	10	1,40

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 12), as variáveis significativas foram: pressão linear e quadrática, temperatura linear e quadrática e tempo quadrático para a germinação de endósporos do *A. acidoterrestris*, em suco de laranja.

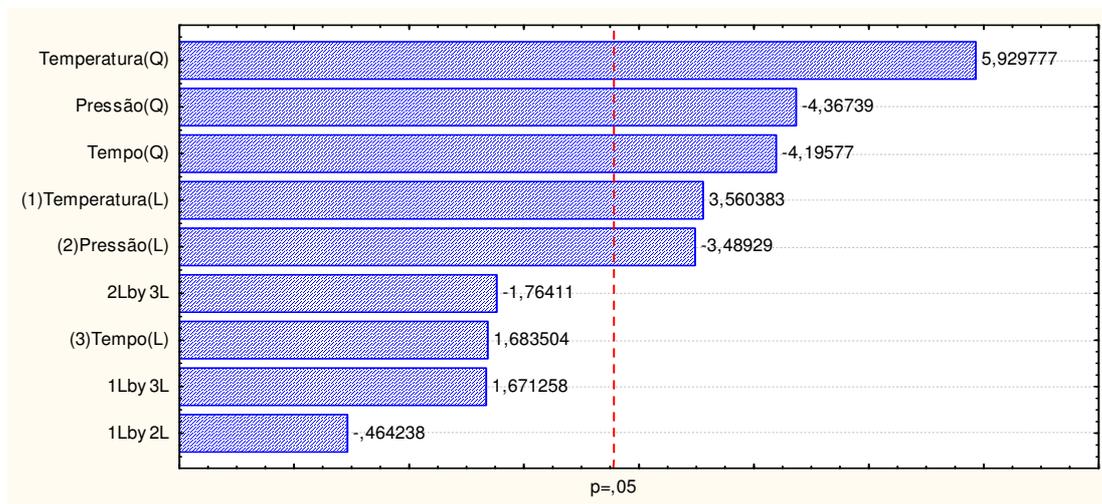


Figura 12. Gráfico de Pareto para efeitos lineares e quadráticos de pressão, temperatura e tempo e suas respectivas interação sobre a germinação dos endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja.

A Tabela 13 apresenta os coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ) da regressão para o modelo polinomial da germinação de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja.

Tabela 13. Coeficientes da regressão para germinação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Parâmetros	Coefficiente Estimado	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Erro padrão	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%	F-valor	p-valor
Intercepto	1,34167	-	-	0,0340	1,2472	1,4361	-	0,0000
T	0,14681	0,07352	1	0,0206	0,0161	0,1306	12,676	0,0235
T <sup>2</sup>	0,24484	0,20394	1	0,0206	0,0651	0,1797	35,162	0,0040
P	-0,14387	0,07061	1	0,0206	-0,1291	-0,0146	12,175	0,0251
P <sup>2</sup>	-0,18033	0,11063	1	0,0206	-0,1474	-0,0328	19,074	0,0119
t <sup>2</sup>	-0,17324	0,31757	1	0,0206	-0,1439	-0,0293	17,604	0,0137

A equação polinomial gerada para o efeito dos termos significativos em relação à germinação de esporos de *A. acidoterrestris* é:

$$\text{Germinação} = 1,34 + 0,15 T + 0,24 T^2 - 0,14 P - 0,18 P^2 - 0,17 t^2 \quad (2)$$

O coeficiente de determinação da equação ( $R^2$ )=0,67 para o modelo foi válido, indicando que ele explica 67% da variação dos dados observados. Conforme Scarminio e Bruns (2001), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) mede a proporção da variação total da resposta que é explicada pelo modelo. Assim, quanto mais próximo de 1 ou 100 % o coeficiente estiver, menor será o erro e melhor o modelo. Segundo os autores, modelos com ( $R^2$ )>0,60 podem ser usados para fins preditivos.

De acordo com o modelo polinomial, o fator que mais contribuiu para o aumento da germinação de esporos de *A. acidoterrestis* foi a temperatura quadrática. Resultados semelhantes foram encontrados por Vercammen et al. (2012), no estudo da germinação de esporos de *A. acidoterrestis*, em molho de tomate. Quando variaram a pressão de 100-800 MPa, com temperaturas de 25, 40 e 60 °C, aplicadas após a pressão, concluíram que a germinação a altas pressões (acima de 300 MPa) mostrou uma forte dependência positiva da temperatura.

Pode-se observar que, apesar da pressão ter sido significativa para a germinação dos esporos de *A. acidoterrestis* DMS 2498, o modelo mostra que a pressão nos níveis utilizados contribuiu para a diminuição da germinação, isso sugere vias fisiologicamente diferentes para a germinação por efeito da temperatura e pressão.

Como esperado, as temperaturas, utilizadas no presente trabalho, por serem moderadas, levaram à baixa germinação dos esporos.

Segundo Buzrul et al. (2005) o *A. acidoterrestis* é capaz de crescer numa faixa muito ampla de temperatura, de 12 a 80 °C. Esses autores concluíram também, que a temperatura desempenhou um papel significativo na inativação do micro-organismo quando foram aplicadas altas pressões (350 MPa a 450 MPa). Vale ressaltar que a inativação ocorre após a germinação do esporo.

Os resultados do presente trabalho, no estudo da germinação do *A. acidoterrestis*, mostram que, apesar de os esporos de *A. acidoterrestis* DMS 2498 serem termorresistentes, temperaturas médias (nos níveis utilizados) proporcionam sua ativação.

As Figuras 13 e 14 ilustram que, à medida que a temperatura aumenta a germinação aumenta. E, à medida que a pressão aumenta a germinação diminui. Isso sugere que os esporos de *A. acidoterrestis* DMS 2498 possam necessitar de pressões moderadas (50 a 300 MPa) para a germinação.

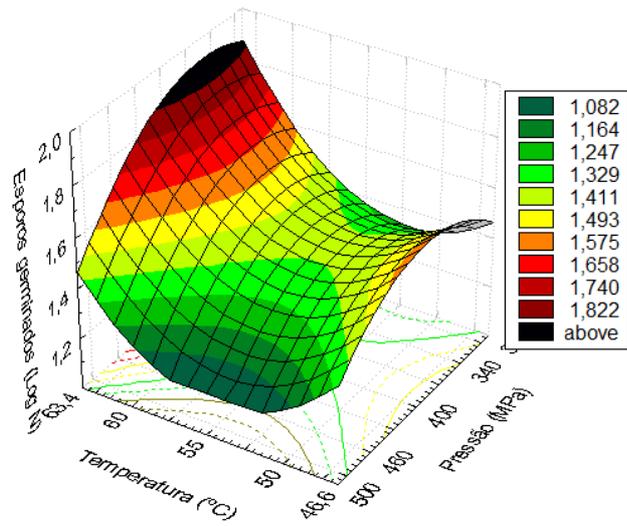


Figura 13. Gráfico de superfície de resposta do log de N, germinação de esporos de *A. acidoterrestis* em suco de laranja.

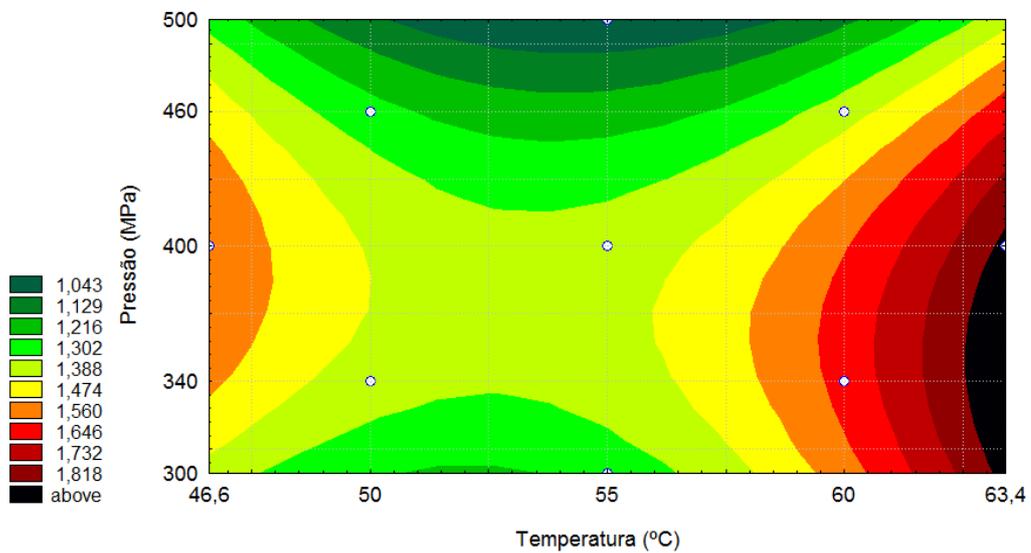


Figura 14. Gráfico da curva de nível do log de N, germinação de esporos de *A. acidoterrestis* em suco de laranja.

#### 4. CONCLUSÃO

O modelo polinomial proposto explicou 67 % da variação dos dados observados. As variáveis estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram: pressão linear e quadrática, temperatura linear e quadrática e tempo quadrático.

O efeito da pressão linear e quadrática e o efeito do tempo quadrático contribuíram de maneira negativa na germinação de esporos. Não houve interação entre as variáveis

De acordo com o modelo polinomial o fator que mais contribuiu para o aumento da germinação de esporos de *A. acidoterrestris* foi a temperatura quadrática.

A germinação de esporos de *A. acidoterrestris* a temperaturas amenas, portanto, pode ser usada como vantagem para melhoramento da qualidade microbiológica de sucos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOUADHI, C.; SIMONIN, H.; PRÉVOST, H.; LAMBALLERIE, M.; MAAROU, A.; MEJRI, S. Optimization of pressure-induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk. *Food Microbiology*, v.30, p.1-7, 2012.

BENASSI JR., M. *Determinação das curvas de maturação das variedades cítricas (Citrus sinensis L. Osbeck) Pera-rio, Natal, Valência e Hamlin*. 2001. 137p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2001.

BRASIL. (2000). Instrução Normativa nº1 de 07 de janeiro de 2000. Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. *Diário oficial da República Federativa*. (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Disponível em:<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do/operacao=visualizar&id=7777>. Acesso em: 29 de janeiro de 2013.

CORRÊA-NETO, R.S.; FARIA. J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.1, p.153-160, 1999.

EICHER R. e LUDWIG, H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.131, p.595–604, 2002.

FERREIRA, E.H. *Avaliação da barorresistência e da termorresistência de *Byssochlamys nivea* em néctar e suco integral de abacaxi*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

IAL. In: I. A. Lutz, *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Brasília: 4ª ed. ANVISA. 2005.

IFU Internationale Fruchtsaft-Union. First standard IFU method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. IFU Method 12. Internationale Fruchtsaft-Union, Paris, 2004.

KALCHAYANANDA, N.; DUNNE, C.P.; SIKES, A.; Raya, B. Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.5, p.277– 283, 2004.

MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H.; YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology*, v.15, p.577-582, 1998.

OLIVEIRA, J.C.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K. A.G.; SANTOS, A.C.; MIGUEL, M.A.L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.241-245, 2006.

OTEIZA, J.M. Imágenes Microbiológicas: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Revista Argentina de Microbiología*, v.43, p.67, 2011.

PEREIRA, M., F.F.C.; GUTIERREZ, N.; ALMEIDA, G. (2006). Procedimentos pós-colheita na produção integradas de Citros. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical., disponível em <[www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento\\_156.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento_156.pdf)>. Acesso em: 23 janeiro de 2013

PONTIUS, A. R. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of Food Protection* , v. 61, p.41–46, 1998.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas, Editora Casa do Pão, 326p, 2005.

STEYN, C.E.; CAMERON, M.; WITTHUHN, R.C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — A review. *International Journal of Food Microbiology*, v.147, p.1–11, 2011.

VERCAMMEN, A.; BRAM, V.; LURQUIN, I. MICHIELS, C.W. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology*, v.152, p.162–167, 2012.

VOLPE, C.A.; SCHÖFFEF, E.R.; BARBOSA, J.C. Influência da soma térmica e da chuva durante o desenvolvimento de laranjas 'Valência' e 'natal' na relação entre sólidos solúveis e acidez e no índice tecnológico do suco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 2, p. 436-441, 2002.

WALLS, I. E CHUYATE, R. *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy food and Environmental Sanitization*, v. 8, p. 495- 522, 1998.

WUYTACK, E.Y.; MICHIELS, C.W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, p. 333–341, 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A germinação de esporos de fungos filamentosos e de bactérias pode ocorrer por tratamentos térmicos e não térmicos como a aplicação de altas pressões. O efeito desses parâmetros pode ser diferente, devido aos mecanismos fisiológicos inerentes de cada grupo de micro-organismo.

No estudo da germinação de esporos do fungo *Byssochlamys nivea*, submetidos a temperaturas amenas (46,6 a 63,4 °C) e altas pressões (300-500 MPa), por 5 a 15 minutos, foram encontrados 5,91 ciclos log de germinação a 55 °C, 500 MPa, por 10 minutos. O modelo polinomial, cujo coeficiente de determinação foi  $(R^2)=0,80$ , proposto foi: germinação =  $4,19 - 0,68 T - 0,06 T^2 + 0,41 P + 0,17 P^2 + 0,04 t - 0,04 t^2 - 0,03Pt$ , demonstrando que pressão foi a variável mais significativa para a germinação de esporos.

Já no estudo sobre a germinação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, submetidos a temperaturas amenas (46,6 a 63,4 °C) e altas pressões (300-500 MPa), por 5 a 15 minutos, foram encontrados 1,96 ciclos log de germinação a 60 °C, 340 MPa por 13 minutos. O modelo polinomial, cujo coeficiente de determinação de  $(R^2)=0,67$ , proposto foi: Germinação =  $1,34 + 0,14 T + 0,24 T^2 - 0,14 P - 0,18 P^2 - 0,17 t^2$  demonstrou que a temperatura foi a variável que mais contribuiu para a germinação dos esporos dessa bactéria.

Observou-se que os esporos de *A. acidoterrestris* com o uso de temperaturas amenas têm o processo de germinação de esporos iniciado, diferentemente dos esporos do *B. nivea*.

Assim a alta pressão pode ser utilizada como pré-tratamento para germinação de esporos de *B. nivea*. E temperaturas amenas podem ser utilizadas como vantagem para a germinação de esporos de *A. acidoterrestris* a fim de melhorar a qualidade microbiológica de sucos.

O entendimento do comportamento desses micro-organismos com o uso da temperatura e pressão sugere novas soluções e, ou alternativas para reduzir os problemas com a deterioração de alimentos ácidos por termo-acidófilos.